

Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, Managua
Instituto Politécnico de la salud
“Dr. Luis Felipe Moncada”
POLISAL UNAN-Managua



Monografía para optar al título de Licenciado en Bioanálisis Clínico

“Utilidad clínica de los índices de maduración reticulocitarios en el diagnóstico de la anemia por deficiencia de hierro en niños en edad pre-escolar procedentes del colegio Público Tenderí-Nindirí y Hospital Manuel de Jesús Rivera La Mascota-Mangua, Julio-Noviembre 2015”

Autores:

- Br. Annia Karelia Rosales Avendaño
- Br. Gerald Nicolás Vásquez Alemán
- Br. Jarinton Enrique Ugarte Torrez

Tutor y asesor científico:

Dr. Allan Pernudi Ubau, MSC, PhD.

Docente Depto. Bioanálisis Clínico

Managua, Mayo 2016

*¡Empecemos a cuestionar todo aquello
que asumimos comprobado!*

Resumen

Se realizó un estudio analítico, transversal con el objetivo de valorar la Utilidad Clínica de los índices de Madurez Reticulocitarios en niños en edad preescolar procedentes del colegio público Tenderí-Nindirí y Hospital infantil Manuel de Jesús Rivera la Mascota- Managua”.

Se realizó una identificación de anemia y una posterior confirmación de deficiencia de hierro a un grupo determinado a infantes entre 2 y 6 años, posterior se conformaron un grupo de individuos con deficiencia de hierro y un grupo de sujetos sanos..

El estudio fue conformado por 90 muestras divididas igualmente en un grupo casos y un grupo control. El análisis de reticulocitos se realizó en el contador hematológico SISME X 4000i. Se corrieron ensayos inmunológicos ELISA Ferritina para determinar el estado de los depósitos de hierro en el organismo y confirmar la deficiencia del antes mencionado mineral.

Se encontraron diferencias entre los conteos porcentual y absoluto de reticulocitos, comprobando el bajo nivel de precisión del conteo reticulocitario porcentual en estado anémico. Mediante la fracción inmadura del reticulocitos se realizó una curva de actividad hematopoyética donde se evidencio que esta se encuentra aumentada en deficiencia de hierro. Las diferencias estadísticas entre las pruebas convencionales para la deficiencia de hierro y planteando que el aumento de la inmadurez de los reticulocitos y el descenso de la hemoglobina reticulocitaria están relacionados con el establecimiento de la deficiencia de hierro.

Se concluyó que el conteo absoluto de reticulocitos aporta información confiable en estado anémico, además que los índices de maduración reticulocitarios indican aumento de la actividad hematopoyética y que la utilización de estos índices puede utilizarse como un marcador confiable y temprano de la deficiencia de hierro,

DEDICATORIA

A Dios.

A Nuestros Padres

A Nuestros familiares

DEDICATORIA

➤ **A mi madre,**

Un ejemplo de lucha y tenacidad. Por el motor que impulsa mi vida, por ser el pilar fundamental de mi formación profesional, por mantenerte firme y fuerte mientras otros pilares se desplomaron.

Gerald V. Alemán

➤ **A Dios,**

Por las fuerzas que me dio durante este periodo de mi vida

➤ **A mis Padres,**

Por el apoyo que siempre me han dado desde el inicio de mi carrera hasta hoy.
A Mario Ugarte y esposa, porque de alguna forma me apoyaron

Jarinton Ugarte

AGRADECIMIENTOS:

Dr. Allan Pernudi, nuestro tutor.

- ❖ Por su incondicional apoyo
- ❖ por inculcarnos y transmitirnos su dedicación a la investigación.
- ❖ Por guiarnos en la realización del presente estudio por más de un año, sin perder el aliento de continuar a pesar del tiempo y las circunstancias.

Lic. Mildred Payan, Responsable del Laboratorio Clínico del Hospital Salud Integral

- ❖ Por todo el realizado por conseguir la aprobación del estudio en su centro de labores
- ❖ Por permitirnos procesar las muestras y obtener los resultados.
- ❖ Por su apoyo durante todas las etapas del muestro y procesamiento de las muestras

MSc. Ligia Lorena Ortega

- ❖ Por su apoyo incondicional durante todo el trayecto de la realización de la presente investigación.
- ❖ Por la búsqueda y ponencia de soluciones en los momentos donde se presentaron impedimentos en el camino rumbo a la culminación el estudio.

Lic. Enmanuel de Trinidad

- ❖ Por su valioso aporte en la asesoría del manejo de los datos estadísticos.

Cuerpo docente del departamento de Bioanálisis Clínico

Por inculcarnos durante 5 años el fruto de la ciencia y el conocimiento, por transmitirnos sus erudiciones y sus técnicas, por apoyarnos a ser mejores profesionales.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	
ADE- RDW	Amplitud de distribución eritrocitaria
BHC	Biometría Hemática Completa
Cells	Células
CHCM	Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media
CRf	Contenido Reticulo-filamentoso
DE	Desviación Estándar
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente ligado a enzimas
Fe	Hierro
FS	Fowars Scatter (detector directo)
GR	Glóbulos Rojos.
Hb	Hemoglobina
HCr	Hemoglobina reticulocitaria
HCM	Hemoglobina Corpuscular Media
HRF	High Reticulocyte Fluorescence (Alta fluorescencia del reticulocito)
Hto/HCT	Hematócrito
IRF	Fraccion inmadura del reticulocito.
IMR, MRI	Índices de Madurez Reticulocitarios
IRF	Fraccion Inmadura del Reticulocitos, por sus siglas en Inglés
LRF	Low Reticulocyte Fluorescence (Baja fluorescencia del reticulocitos)
MRF	Medium Reticulocyte Fluorescence (Media fluorescencia del reticulocito)
RBC	Glóbulos rojos, por sus siglas en ingles
Ret-He	Hemoglobina reticulocitaria
SER	Sistema Reticulo Endotelial
SS	Side Scatter (detector lateral)
Tf	Transferrina
TfR	Receptor de Transferrina
TMO	Trasplante de Medula ósea
VCM	Volumen Corpuscular Medio

Contenido	No. Pág.
-Resumen	i
-Dedicatoria	ii
- Agradecimientos	iv
- Abreviaturas y acrónimos	v
- Índice	vi
I- Introducción	1
1.1- Antecedentes	3
1.2- Justificación	5
II- Planteamiento del Problema	7
1.1- Hipótesis	8
1.2- Objetivos	9
III- Marco Teórico	10
1- Automatización en hematología	10
1.1- Principio apertura- Impedancia	10
1.2- Principio de Dispersión lumínica	11
1.3- Citometria de flujo	11
2- parámetros reticulocitarios	13
2.1- El Reticulocitos como célula	13
2.2- Determinación mediante Método tradicional	14
2.2.1- Desventajas del método manual en el conteo de reticulocitos.	15
2.3- Determinación automatizada de reticulocitos	15
2.3.1- Conteo Global de reticulocitos	16
2.3.2- Índices de maduración reticulocitaria (IMR)	16
2.3.2.1- Fracción Inmadura del reticulocitos (IRF)	19
2.3.3- Contenido de Hemoglobina en el reticulocito (CHr ó Ret-He)	20
3 -Diferencias entre el conteo porcentual y absoluto de reticulocitos	20
3.1- Causas de error del conteo porcentual.	20
4- Reticulocitos como marcadores de actividad eritropoyética	22
4.1- Clasificación de las anemias según el conteo reticulocitarios.	22
4.2- Actividad eritropoyética en deficiencia de hierro.	23
5- Relación entre diagnóstico de la deficiencia de hierro e índices reticulocitarios.	24
5.1- avistamiento general a las anemias	24
5.1.1- Clasificación	25

5.2 Anemia ferropénica	26
5.2.1- Intercambio del hierro y utilización de los depósitos	26
5.2.2 - Función del hierro	27
5.2.3- Diagnóstico de la deficiencia de hierro	28
5.2.3.1- Estudio de laboratorio	28
5.3- Impacto del análisis reticulocitario en la deficiencia de hierro.	32
5.3.1- Determinación del estatus regenerativo o	32
5.3.2 Comportamiento del conteo reticulocitario en la deficiencia de hierro.	36
5.3.3- Índices de Maduración reticulocitarios y fracción	33
5.3.4- Contenido de Hemoglobina reticulocitario y deficiencia de Hierro.	34
IV DISEÑO METODOLÓGICO	35
1.1- Tipo de estudio	35
1.2-Área de estudio	35
2.3- Universo y muestra	35
1.4- Criterios de inclusión para la lección de los grupos	35
1.5- Tipo de muestro	36
1.6- Aspectos éticos de la investigación	36
1.7- Etapa pre-muestreo	37
1.5- muestreo	38
1.9- Análisis de laboratorio	38
1.10- Análisis, procesamiento y presentación de los Datos	40
2- Operacionalización de variables	41
V -RESULTADOS	43
1- Diferencias entre los valores porcentual y absoluto con respecto al conteo reticulocitario mediante citometría de flujo.	43
2- Comportamiento de activación hematopoyética medular en estado deficiente de hierro.	45
3- Diferencias estadísticas de las pruebas screening para identificación de deficiencia de hierro e índices de madures de los reticulocitos.	47
VI DISCUSIÓN	49
1- Diferencias entre los valores porcentual y absoluto con respecto al conteo reticulocitario mediante citometría de flujo.	49
2- Comportamiento de activación hematopoyética medular en estado deficiente de hierro.	51

3- Relación entre la deficiencia de hierro e índices de madures de los reticulocitos.	53
VII - CONCLUSIONES	55
1.1- Recomendaciones	56
VIII - Referencias	57
IX - ANEXOS	
Anexo 1: Consentimiento informado	
Anexo 2: Base de datos de los resultados de las pruebas convencionales e índices de madures del reticulocito.	
Anexo 3: Estadísticas Descriptiva de grupos	
Anexo 4: Gráficos de diferencias de medias de pruebas convencionales para el diagnóstico de deficiencia de hierro e índices reticulocitarios.	
Anexo 5: Resumen de la Prueba de Kolgomorov- Smirnof, generada en el software SPSS 20.0	
Anexo 6: Forma Gráfica de la distribución de algunos datos generados por la prueba de Kolgomorov-Smirnof como criterio para escoger la prueba a utilizar para diferenciar medias	
Anexo 7: Resultados de la Prueba t-student para muestras independientes ejecutada en el software SPSS 20.0	
Anexo 8: Resultados de la U de Mann Whitney para muestras independientes ejecutada en el software SPSS 20.0	

I- INTRODUCCIÓN

El aumento de la población a gran escala a nivel mundial junto al crecimiento en la calidad de vida ha conllevado a un aumento en la demanda de los servicios y atenciones básicas, uno los servicios con más demanda es, sin duda, la atención hospitalaria. Como respuesta a la creciente demanda se ha venido desarrollando e implementado, de la mano con el gran avance tecnológico de la electrónica, robótica e informática, la ejecución de los procesos analíticos mediante equipos automatizados con la participación mínima del ser humano durante la fase analítica, estos avances han lograda garantizar mediciones de mayor precisión y elevado nivel de exactitud, eliminando de esta forma factores que durante mucho tiempo causaron disturbios en los resultados, que van desde pipeteos inadecuados, fatiga, distracciones, estrés, entre otros, que pasaban ciertamente desapercibidos en muchas ocasiones.

No cabe duda que entre los avances más codiciosos e impresionante se destaca la introducción de los contadores hematológicos automatizados, que implementados desde la última década del S XX, han representado un gran avance para el estudio de trastornos sanguíneos, en estos pueden realizarse conteos diferenciales por métodos innovadores, asegurando una mayor precisión y exactitud que el método microscópico tradicional.

En otra índole, el análisis de reticulocitos ha sido a lo largo de la historia del diagnóstico de la enfermedad una herramienta muy útil y ha gozado de mucha popularidad, un punto a favor para que este análisis goce de popularidad es la facilidad con el material ribosomal contenido en este se precipite con el azul de crecil brillante, además de que a pesar de ser el último eslabón del recorrido hematopoyético rumbo a la madurez eritrocítica, puede encontrarse en sangre periférica de relativamente fácil obtención, lo que ha constituido del análisis del mismo un método muy accesible, de bajo costo y de importante impacto clínico en la complementación del el estudio de las anemias.

Los equipos de conteo automatizado obsoletos no podían identificar a los reticulocitos, debido que la única diferencia entre estos y los eritrocitos es la leve

diferencia de tamaño y hemoglobina, además del contenido interior de material ARNribosomal reticulocitario vestigio de la síntesis de ADN y proteínas de las células precursoras, ausente totalmente en los eritrocitos, por este hecho, bajo el principio de funcionamiento de los antes mencionados contadores, los reticulocitos solían contarse como eritrocitos de mayor tamaño.

Al captar el análisis de reticulocitos mas auge surge la necesidad de desarrollar métodos de conteo automatizado que logren discriminar a estos del resto de células, principalmente de los hematíes.

Después de desarrollar los métodos de conteo se logró profundizar el análisis de reticulocito más allá del conteo tradicional. Los índices de maduración reticulocitarios (IMR o RMI por sus siglas en inglés) son un conjunto de parámetros incluidos dentro del paquete de determinaciones que ofrecen algunos equipos de conteos automatizados, el cual avanzó desde la determinación del número absoluto o porcentual hasta un criterio que mide su nivel de maduración basados en fluorescencia del ARN de los mismos.

El hallazgo de la medición de los niveles de maduración pueden llegar a darnos una idea del comportamiento medular si es interpretado en conjunto con otras pruebas de laboratorio, y así lograr obtener un impacto importante en el estudio de diversas enfermedades, ya que el diagnostico no queda limitado solamente al conteo.

El análisis automático de reticulocitos está al alcance de los laboratorios de hematología desde los años 90 y será probablemente el método en los hospitales que curse de mediana a gran importancia en los próximos años. Además posee mejor precisión, lo cual optimiza su calidad analítica.

1.1- ANTECEDENTES

La implementación de los conteos y clasificación de maduración de los reticulocitos en equipos automatizados ha inspirado a varios investigadores a profundizar en la aplicación de dichos parámetros para complementar el diagnóstico o el seguimiento de diversos de trastornos hematológicos.

Uno de los Primeros estudios realizados en este ámbito fue en el año 1991, en Bergen, Noruega, donde un grupo de investigadores realizo un ensayo experimental que proponía la estandarización de la Tincion “Thiazole Orange” de entre 18 diferentes métodos existentes hasta la fecha para la determinar Índices de maduración del reticulocito. Para esto se realizó un análisis de 185 muestras de pacientes anémicos y no anémicos en dos diferentes equipos de conteo (EPICS 541 y Profilles II) en los cuales se demostró que existen pocas diferencias y variaciones, concluyendo que esta tinción puede aplicarse confiablemente. (Davis, Dicorato, Bigelow, & Langweiller, 1991)

En Argentina en 1995, se realizó un estudio a 10 paciente post aplasia medular, a quienes se les realizo el análisis de los IMR a un tiempo transcurrido de 17.6 días. Los resultados mostraron que el recuento diferencial de reticulocitos por citometría de flujo con establecimiento de un índice de madurez reticulocitaria (IMR) puede constituir un indicador precoz de recuperación de la función medular post aplasia. (Dubner, Gissone, & Perez, 1995).

En Buenos Aires en el año 2002 se realizó un estudio para valorar a través de indicadores evolutivos y de recuperación medular el comportamiento de pacientes post-transplantados de médula osea después de irradiación corporal total. Se implementó el Índice de maduración reticulocitaria resultando en todos los pacientes un descenso del IMR más rápidamente que el número total de reticulocitos. Después del período aplásico el aumento en el IMR precedió al incremento de reticulocitos totales por varios días. (Dubner et. al.,2002)

En 2006 en Polonia se realizó un estudio a 46 niños con diferentes neoplasias junto a un grupo control constituido por 40 niños sanos a quienes realizaron

determinación de la fracción inmadura del reticulocito junto al número de neutrófilos para constatar la recuperación de los pacientes. Se encontró que el IFR aumento en pacientes en recuperación de forma más rápida que el número de neutrófilos, por lo que se concluyó que el IRF es un predictor fidedigno de recuperación en niños que cursan diferentes neoplasias. (Łuczyński et. al., 2006)

En Brasil, en el 2014 se realizó un estudio valorando los índices de maduración reticulocitarios en pacientes con anemia ferropénica en edad preescolar y pacientes sanos de la misma edad. Se observaron diferencias significativas para índices de fluorescencias medios y altos entre los grupos estudiados, por lo que se concluyó que los IMR son útiles para un diagnóstico temprano de deficiencia de hierro. (Wollmana et. al., 2014)

En Nicaragua aún no se han realizado estudios con relación a parámetros reticulocitarios de madurez.

1.2- JUSTIFICACIÓN

En Nicaragua, los equipos de conteo automatizado, han tomado un auge creciente en los últimos años y se encuentran ampliamente difundidos, a la fecha muchos centros hospitalarios cuentan con estos equipos para la rutina diaria. Existen casos en que los parámetros de dichos equipos son de utilidad clínica desconocida por el personal médico, debido a la falta de investigación y/o divulgación. Un ejemplo claro son los índices de maduración reticulocitarios.

En Managua, se constató que algunos centros de atención hospitalaria como el Hospital Salud Integral, Hospital Militar Alejandro Dávila Bolaños y Hospital Metropolitano Vivian Pellás ofertan dichos índices sin aplicación en la práctica clínica.

Al tomar en cuenta principios fisiológicos es importante recordar que los reticulocitos representan a los eritrocitos inmaduros en el estadio final de diferenciación y en la deficiencia de hierro los eritrocitos tienen una vida media y funcionalidad disminuida que conlleva a una mayor demanda en sangre periférica, sin embargo la deficiencia de hierro es una condición anémica de tipo arregenerativa por lo que un aspecto interesante a captar es el comportamiento medular yendo más allá del conteo reticulocitario, por lo cual una gradificación de la madurez de los reticulocitos en esta condición sería un punto clave en el aporte de información valiosa para el diagnóstico de la deficiencia de hierro.

Si bien es cierto que en todos los trastornos hematológicos en que los reticulocitos tienen actividad crucial, es inevitable especular que los IMR podrían ser de importancia en toda la gama de anemias que se incluyen tanto en el grupo de las regenerativas como el de las arregenerativas, no obstante la presente investigación se inclina por la determinación de estos índices en la deficiencia de hierro como objeto de estudio dado a que esta ha sido históricamente un problema persistente de salud a escala mundial, las tasas de prevalencias son considerables tanto en los países pobres como en los desarrollados y afectan a personas en todas las edades, siendo los más vulnerables los niños en edad preescolar y féminas

adolescentes en desarrollo, por lo que es importante investigar criterios fuera de lo convencional para mejorar su diagnóstico y seguimiento.

En nuestro país el diagnóstico de la deficiencia férrica en muchos centros públicos de atención hospitalaria se realiza en base a la historia clínica del paciente, hemoglobina, hematocrito y constantes corpusculares. (Zelaya Montiel, 2013, pág. 23)

Con respecto al diagnóstico mediante citometría de flujo, Mckenzie(2000) afirmó:

La instrumentación más nueva para análisis por Citometría de flujo de los reticulocitos permite valorar su madurez [...], la capacidad para distinguir la madurez aumenta la utilidad de su análisis citométrico de flujo en la evaluación de la actividad eritropoyética [...]. Es claro que el futuro de la Citometría en el laboratorio clínico es brillante. (pag. 803)

Es notorio que los IMR podrían jugar un papel crucial en el diagnóstico de la deficiencia de hierro. En base a esto, se realiza el presente estudio con el fin de demostrar que los índices de maduración reticulocitario, actualmente sin uso clínico, pueden aportar información de importancia en el diagnóstico de anemia ferropénica y que su implementación es capaz de conducir hacia un diagnóstico certero y precoz diagnóstico de la deficiencia de hierro y beneficiar de esta forma tanto a los médicos quienes acercarían el diagnóstico confirmativo como a personas que padecen dicha deficiencia, además estos parámetros podrían reducir los costos de pruebas económicamente altas como la ferritina.

II- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es un hecho muy claro la necesidad latente de profundizar en la investigación de nuevos métodos y técnicas para avanzar en el diagnóstico de los diferentes padecimientos humanos, Por otro lado, un acontecimiento indiscutible son las altas prevalencias de deficiencia de hierro en la población mundial, tanto en países desarrollados como en los que están en vías del desarrollo.

Las aplicaciones de los parámetros de inmadurez reticulocitarios ya han sido objetivo de diversas investigaciones en diversos países, demostrando en estos estudios importantes resultados para el diagnóstico de diversos padecimientos. En Nicaragua de igual forma existen todos los elementos necesarios para indagar al respecto, por lo que se plantea la siguiente pregunta:

¿Cuál es la utilidad clínica de los Índices de Maduración Reticulocitarios en el diagnóstico de la anemia por deficiencia de hierro en niños en edad preescolar procedentes del colegio público Tenderí, Nindirí y Hospital Manuel de Jesús Rivera La Mascota?

Partiendo de este planteamiento se infieren las siguientes preguntas directrices:

- ✓ En el análisis simultaneo del conteo reticulocitarios de una misma muestra, ¿Militan diferencias entre los valores porcentual y absoluto con respecto al conteo reticulocitario mediante citometría de flujo en niños con deficiencia de hierro?
- ✓ En la anemia ferropénica, caracterizada por presentar comportamiento arregenerativo, ¿Existen evidencias de comportamiento de activación hematopoyética medular mediante el estudio de los índices de maduración reticulocitarios?
- ✓ Mediante un estudio de casos y controles es posible demostrar si ¿existen diferencias estadísticamente significativas entre pruebas convencionales para el diagnóstico de la deficiencia de hierro e índices de madures reticulocitarios que comprueben la relación de los mismos?

1.1- HIPÓTESIS

El problema planteado nos infiere a proyectar dos propuestas hipotéticas científicamente razonables:

H₀: No existen diferencias significativas entre los índices de maduración de los reticulocitos de los casos y los controles que comprueben la relación de los mismos con el diagnóstico de la deficiencia de hierro.

H₁: Existen diferencias significativas entre los índices de maduración de los reticulocitos de los casos y los controles que comprueben la relación de los mismos con el diagnóstico de la deficiencia de hierro.

1.2- OBJETIVOS

Consecuente al anterior planteamiento, se establecen los siguientes objetivos de investigación:

➤ **General**

Demostrar la utilidad clínica de los índices de madurez Reticulocitarios en el diagnóstico de anemia por déficit de hierro en niños en edad pre-escolar del colegio público Tenderí-Nindirí y Hospital Manuel de Jesús Rivera La Mascota- Mangua

➤ **Específicos**

- ✓ Analizar si hay o no diferencias entre los valores porcentual y absoluto con respecto al conteo reticulocitario mediante citometría de flujo en niños con deficiencia de hierro.
- ✓ Evaluar si hay comportamiento de activación hematopoyética medular en estado deficiente de hierro mediante el estudio de los índices de maduración reticulocitarios.
- ✓ Demostrar diferencias estadísticamente significativas entre pruebas convencionales para el diagnóstico de la deficiencia de hierro e índices de madures reticulocitarios que comprueben la relación de los mismos mediante un estudio de casos y controles

III- MARCO TEÓRICO

1- AUTOMATIZACIÓN EN HEMATOLOGÍA

“Los primeros contadores fueron descritos por Coulter y Crosland-Taylor, quienes adoptaron diferentes enfoques para limitar el volumen en la zona sensora y realizar el recuento” (Fink, 2005, pág. 6).

En la actualidad se utiliza una gran variedad de instrumentos automatizados para realizar los recuentos sanguíneos. Los instrumentos semiautomatizados requieren que algunos de los pasos intermedios (p. ej., la dilucion de una muestra sanguinea) los realice un operador.

1.1- Principio apertura- Impedancia

En el instrumento descrito por Coulter, las células son conducidas a través de un estrecho orificio, detectándose los cambios de impedancia.

Para contar los hematíes, se hace una dilución importante de la sangre en una solución de electrolitos tamponada

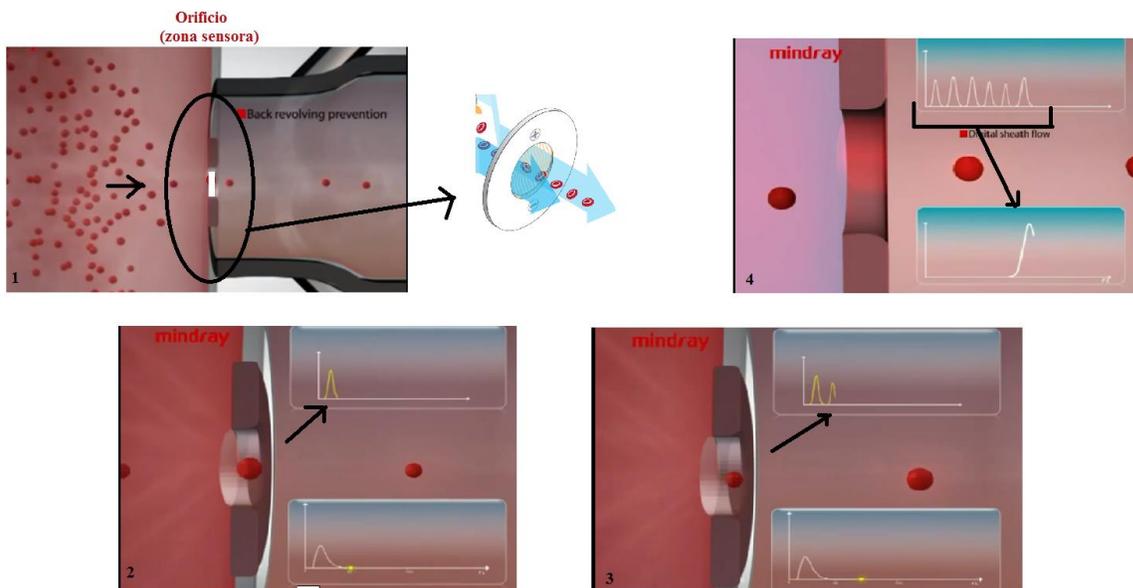


Figura: 1- Principio de la impedancia. (Mindray corp., 2009) Las células pasan por el orificio o zona sensora. 2,3- la célula impide el paso de la corriente magnética, lo que genera una señal proporcional al tamaño de la célula. 4- el conjunto de señales generan un histograma.

La impedancia es efectivamente medida en la zona censora situada entre los electrodos colocados a ambos lados del orificio. Así, las células funcionan como aislantes frente a los diluyentes salinos, de modo que la impedancia aumenta transitoriamente a medida que las células pasan a través de la zona sensora. Los cambios de impedancia transitorios producen impulsos eléctricos que pueden ser contados. Dichas pulsaciones pueden mostrarse en la pantalla de un oscilógrafo. Las pulsaciones se llevan a un circuito con un umbral provisto de un discriminador de amplitud para seleccionar la altura mínima de las pulsaciones que se contarán. La altura de las pulsaciones se utiliza para determinar el volumen de los eritrocitos.

1.2- Principio de Dispersión lumínica

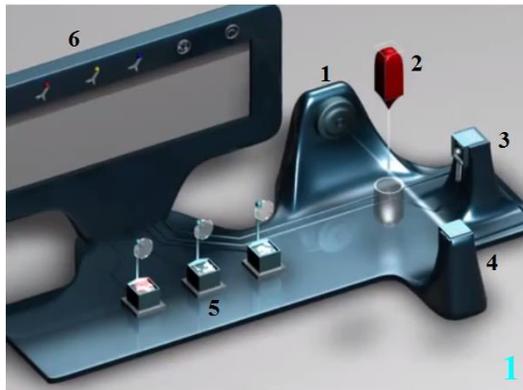
En el instrumento descrito por Crosland-Taylor “Los eritrocitos y otras células sanguíneas pueden contarse por medio de detectores electroópticos” (Lewis, Baian, & Bates, 2007, pág. 37). Este principio se basa en hacer que las células pasen a través de un delgado haz de luz. La zona sensora estaba restringida parcialmente por la estrechez del haz de luz y por el pasaje de células en una corriente de líquido muy delgada. A medida que las células pasan a través de la zona sensora, interceptan el haz de luz que se dispersa, pudiendo ser colecta un fotómetro.

Los aumentos transitorios en la luz dispersada crean impulsos desde el fotómetro, que luego pueden ser contados electrónicamente. (Fink, 2005)

1.3- Citometría de Flujo

“La Citometría de flujo fue introducida en el laboratorio Clínico en el decenio de 1980. La evolución de la Citometría de flujo se produjo como resultado del desarrollo de los anticuerpos monoclonales en el decenio de 1970” (McKenzie, 2000).

Los anticuerpos monoclonales conjugados con una marca fluorescente permite el estudio de las propiedades físicas y biológicas de una célula.



- 1- Rayo Laser
- 2- Sistema de flujo (contenedor de cells)
- 3 Side Scatter (Detector Lumínico)
- 4- Foward Scatter (Detector Lumínico)
- 5- Detectores Fluorescentes
- 6- Sistema de registro de la información

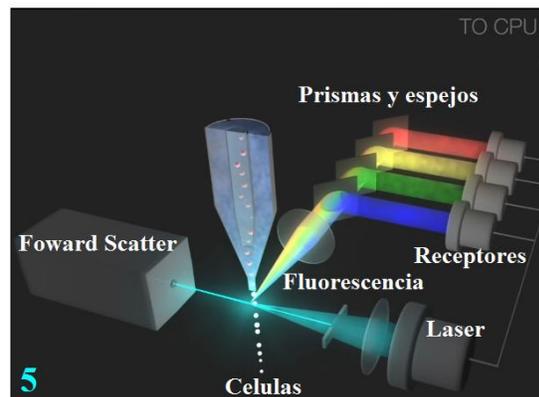
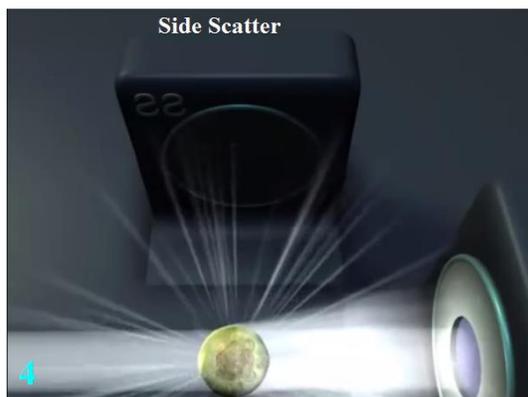
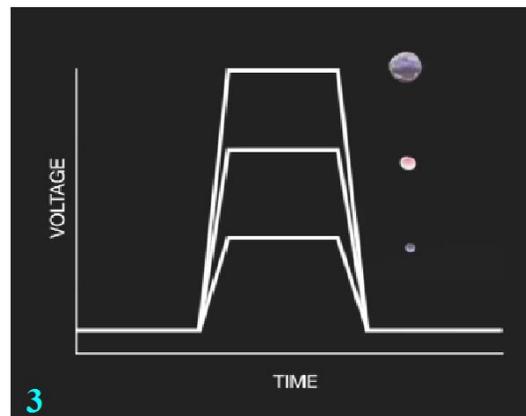
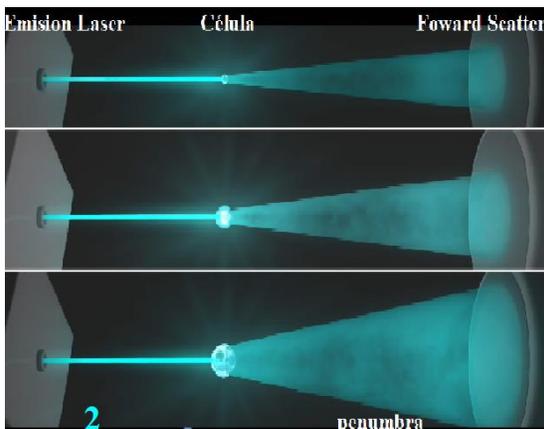


Figura 2: Principio del citómetro de flujo. 1. Partes de un citómetro de flujo, 2- Cuando la célula atraviesa el láser provoca una penumbra longitudinalmente al mismo, denominada Foward Scatter, esta penumbra es proporcional al tamaño de la célula y es captada por un detector luminoso en el recorrido del láser, 3- Con relación al tamaño de la penumbra se crean histogramas que visualizan el tamaño de la población Celular, 4- Las organelas intracelulares provocan difracciones del haz de luz, el nivel de la difracción del haz de luz es proporcional a la complejidad del citoplasma de la célula, y es detectado por un detector lumínico perpendicular al laser denominado detector Side Scatter., 5- La célula es marcado con fluorocromos por medio de anticuerpos monoclonales. Al ser atravesadas por la luz del láser los fluorocromos son

excitados produciendo fluorescencia, que es detectada por diferentes receptores que luego los convierte en información electrónica que es enviada hacia un ordenador informático

El principio en el que se basa esta tecnología es simple:

Hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora. (Drago Serrano, y otros, 2004)

2- PARÁMETROS RETICULOCITARIOS

2.1- El Reticulocitos como célula

En la escala de maduración eritroide, el reticulocito está situado como la célula predecesora del hematíe. Es un eritrocito joven pero sin núcleo que aun contiene remanentes del ácido ribonucleico ribosómico (ARN) que estuvo presente en grandes cantidades en el citoplasma de los precursores nucleados de los cuales provienen, probablemente, la perdida completa del material basófilo se produzca en la corriente sanguínea; sobre todo en el bazo después de que las células hayan abandonado la medula osea. Después de 2 a 2 1/2 días en la medula osea, el reticulocito es liberado a la sangre periférica, continuando aquí su maduración por 1 día más.

Los eritrocitos son un poco más grandes que los eritrocitos maduros y significan maso menos el 1% de los eritrocitos circulantes.

El número de reticulocitos en sangre periférica es un reflejo bastante preciso de la actividad eritropoyética, asumiendo que los reticulocitos se liberan normalmente por la medula osea y que permanecen en la circulación por un periodo de tiempo normal. Estas premisas no son siempre validas, porque un aumento del estímulo eritropoyético produce una liberación prematura a la circulación. El tiempo medio de maduración de los denominados reticulocitos estimulados o de estrés puede durar

hasta 3 días. En tales casos, se podrá encontrar en la circulación una proporción mayor de lo normal de reticulocitos inmaduros. Se puede realizar una evaluación más precisa de la maduración de los reticulocitos mediante una Citometría de flujo cuantitativa de su contenido en ARN. Sin embargo, habitualmente se obtiene una información adecuada a partir de un recuento reticulocitario simple registrado ya sea como un porcentaje de los eritrocitos o, preferiblemente, cuando se conoce el RE, como el número en valor absoluto por litro.

2.2- Determinación mediante Método tradicional

Los reticulocitos son eritrocitos jóvenes, como se mencionaba, aún posee material ribosomal. Los ribosomas tienen la propiedad de reaccionar con ciertos colorantes básicos como el azul B, el azul de cresil brillante o el nuevo azul de metileno para formar un precipitado azul o púrpura de los gránulos o de los filamentos. (Lewis, Baian, & Bates, 2007)

Esta reacción se produce únicamente en las preparaciones tenidas vitalmente, sin fijar. Los estadios de la maduración pueden identificarse por sus características morfológicas.

El primer intento para clasificar a los reticulocitos por madurez lo realizó Heilmeyer en 1932. Los dividió en 4 categorías de acuerdo al contenido retículo filamentoso. El método estaba basado en la observación microscópica luego de la coloración con un colorante supravital: Azul brillante de Cresilo. (Alonzo, 2013 , pág. 67)

De esta forma si, los reticulocitos más inmaduros son los que presentan una cantidad mayor de material precipitable; en los menos inmaduros, solo se observan unos cuantos puntos o algunas hebras cortas. Los reticulocitos pueden clasificarse en cuatro grupos que van desde los más inmaduros, con una gran acumulación de reticulina (grupo I), hasta los más maduros, con unos cuantos gránulos de reticulina (grupo IV).

Los reticulocitos se pueden contar manualmente con un microscopio de fluorescencia en extensiones tenidas de forma adecuada.

2.2.1- Desventajas del método manual en el conteo de reticulocito

Una de las principales desventajas al momento de realizar el conteo de reticulocitos al microscopio, es la dificultad de diferenciar un reticulocitos de hematíes con inclusiones citoplasmáticas. Este suele ser difícil porque los reticulocitos más maduros solo contienen unos cuantos puntos o hebras de material reticulofilamentoso.

Para lograr optimizar la diferenciación es necesario una excelente tinción, pero aun así es necesario que el analista sepa diferenciar las inclusiones citoplasmáticas de los gránulos ribosomales escasos en la membrana del hematíe.

2.3- Determinación automatizada de reticulocitos

Los recuentos de reticulocitos teñidos con varios colorantes pueden realizarse en un instrumento automatizado, diseñado para ese propósito, tal como el Sysmex XT4000i, o en un citómetro de flujo convencional.

Recientemente otros contadores hematológicos han incorporado una opción de recuento de reticulocitos, en los que éstos deben ser coloreados de modo independiente y luego son introducidos dentro del contador para su análisis.

Al contar con una población relativamente abundante la precisión del conteo automatizado es muy superior a la de los recuentos y se elimina el elemento subjetivo inherente al reconocimiento de reticulocitos tardíos, con respecto a esto Alonzo (2014) afirma: “Los Reticulocitos automatizados nos aseguran un alto nivel de reproducibilidad y precisión. Entre 10000 y 30000 glóbulos rojos son evaluados por minuto” (pag. 68).

En el caso de mediciones hechas con colorantes fluorescentes, de acuerdo con la intensidad de fluorescencia, los reticulocitos se pueden dividir en tres sectores que representan estadios diferentes de maduración.

Los reticulocitos en circulación en condiciones normales poseen una determinada cantidad de ARN, que es relativamente baja. Cuando hay una salida prematura a

circulación de los reticulocitos, estos contienen mayor ARN, por lo que su grado de maduración es menor.

En pacientes en recuperación medular estos índices son de vital importancia, ya que si los índices inmaduros aumentan quiere decir que la médula ósea está fabricando hematíes y los está liberando, esto se vería acompañado de un incremento del número de reticulocitos.

Para lograr un eficiente conteo de reticulocitos es necesario que el equipo se encuentre correctamente calibrado y cumplir con la realización periódica exhaustiva de control de calidad, de lo contrario se brindarían resultados erróneos.

2.3.1- Conteo Global de reticulocitos

El conteo reticulocitario no es capaz de dar indicios de la madurez de este, pero antes de iniciar un estudio es importante valorarlo antes de los otros parámetros. Como antes se menciona, el conteo global de reticulocitos es importante para establecer la piedra angular en la causa de la anemia. En el caso de la deficiencia de hierro, al haber una deficiencia de este mineral, hay un descenso en la producción de hemoglobina, y hay una reducción en la capacidad de generar más eritrocitos y una mayor dificultad en regenerar el número total. Por lo que encontrar un indicio de reducción en los reticulocitos puede indicar un descenso en la producción de eritrocitos a nivel medular, como ocurre en la deficiencia de hierro.

2.3.2- Índices de maduración reticulocitaria (IMR)

“Estos parámetros de inmadurez reticulocitaria, que actualmente tienen un uso limitado, pueden ser usados para estimar la reducción de la vida media eritrocitaria y mejorar el tratamiento de una variedad de anemias, en la recuperación post-quimioterapia y en el TMO” (Fink, 2005).

Los recuentos automatizados de reticulocitos se basan en la combinación de diversos colorantes y fluorocromos con el ARN de los reticulocitos (Sismex Corporation, 2012, pág. 2). Tras la unión con el colorante, las células fluorescentes pueden contarse utilizando un citómetro de flujo. La mayoría de los contadores sanguíneos completamente automatizados incorporan actualmente la capacidad

para contar reticulocitos, de forma que ya no es necesaria la utilización de un contador de solo reticulocitos ni el uso de un citómetro de flujo de uso general. (Lewis, Baian, & Bates, 2007)

Con este método automatizado, los reticulocitos pueden ser clasificados en tres grupos según su intensidad de fluorescencia que reflejan su madurez: la proporción de fluorescencia baja (LFR), la proporción de fluorescencia Media (MFR), y la proporción de fluorescencia alta (HFR). Por consiguiente, se relacionan los niveles intracelulares de ARN directamente a la intensidad de fluorescencia, pero inversamente al grado de maduración de los reticulocitos.

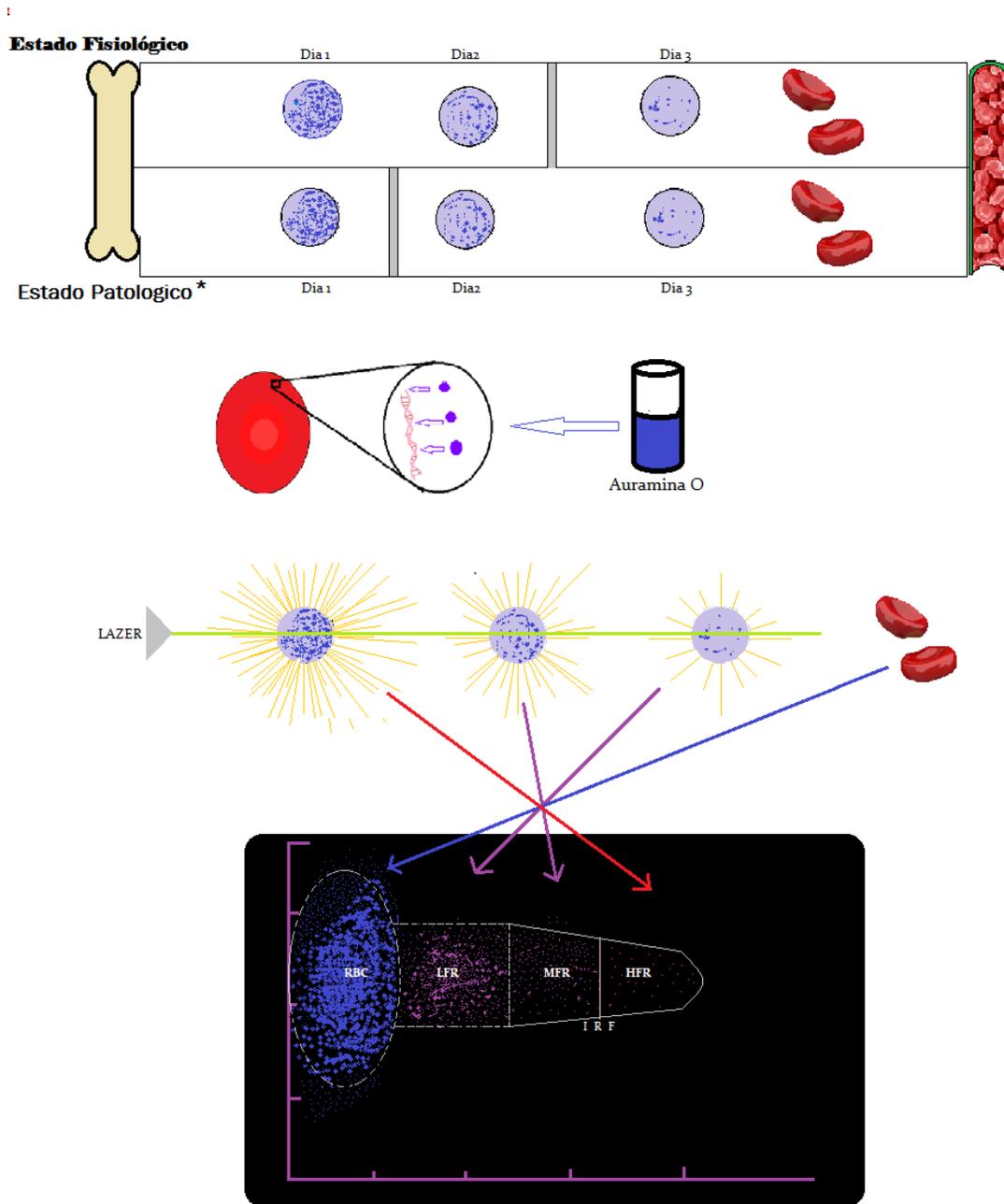
Los colorantes utilizados en los diferentes sistemas incluyen la auramina O (Sysmex), el naranja de tiazol (ABX) y el CD4K 530 (Abbott), así como colorantes no fluorescentes como la oxazina 750 (Bayer-Technicon) y el tradicional nuevo azul de metileno (Beckman-Coulter, Abbott) (National Committee for Clinical Laboratory Standards and, 2004).

Tras la tinción, es necesario separar los reticulocitos de los hematíes no teñidos y, como los colorantes también se combinan con el ADN de las células nucleadas, hay que excluir también estas células. El umbral para esta exclusión está determinado por la intensidad de la fluorescencia y el tamaño de las partículas. Aunque la separación entre los reticulocitos y los hematíes maduros no siempre está bien delimitada, los recuentos automatizados de reticulocitos se correlacionan bien con los recuentos manuales de estos, pero los recuentos absolutos pueden diferir porque los recuentos automatizados dependen de las condiciones de la incubación y del método de calibración del instrumento. Los recuentos automatizados de reticulocitos son bastante estables en la sangre almacenada durante 1-2 días a temperatura ambiente o hasta 3-5 días a 4 °C.

Con respecto a la utilidad, hasta la fecha se maneja que:

El estadio más joven, muy fluorescente, es un indicador temprano de recuperación, que aparece antes de un recuento de reticulocitos total elevado. Un alto recuento de elementos muy fluorescentes es un indicador de recuperación medular después

de, por ejemplo, un trasplante de médula ósea (TMO) o de la administración de eritropoyetina exógena. (Fink, 2005, pág. 10)



* En este caso se define estado patológico como un estado en donde hay en circulación periférica un aumento de inmadurez reticulocitaria.

Figura 3: Metodica de determinación de los IMR. (Fuente: Realización propia). En estados anormales puede haber salida de reticulocitos muy jóvenes a sangre periférica que indica una mayor actividad eritropoyética, esta actividad puede ser medida al realizar un análisis del contenido de ARN de los reticulocitos. Se realiza una tinción a las células sanguíneas con

Auramina O, la cual se precipitara en presencia de ARN, estos reticulocitos teñidos son expuestos a un rayo láser el cual emitirá fluorescencia, la fluorescencia producida es captada por fotodetectores y registrada en un circuito de cómputo dividiendo los reticulocitos en 3 grupos (LRF, MRF, HRF). La fluorescencia emitida por el reticulocito mediante citometría de flujo es directamente proporcional a la inmadurez del mismo e inversamente proporcional a la madurez. A mayor cantidad de CR-f mayor es la fluorescencia y mayor es la inmadurez, a un bajo CR-f baja es la fluorescencia y alta la madurez. Los niveles de fluorescencia alto y medio (HRF, MRF) dan lugar a la fracción inmadura del reticulocito IRF.

2.3.2.1- Fracción Inmadura del reticulocitos (IRF)

Proporcionan una medida de los diversos grados de maduración de los reticulocitos ya que los reticulocitos más inmaduros, producidos cuando los niveles de eritropoyetina están elevados, tienen más ARN y emiten una fluorescencia más fuerte que los reticulocitos maduros normalmente presentes en la sangre periférica. Los parámetros que indican la inmadurez de los reticulocitos tienen una trascendencia clínica potencial. Por ejemplo, un aumento en la intensidad de la fluorescencia media, indicativa de la presencia de reticulocitos inmaduros, se ha observado como un signo precoz de implante del injerto tras un trasplante de médula ósea (Lewis, Baian, & Bates, 2007).

En síntesis “Los métodos para **IFR** identifican poblaciones de diferente madurez y se define como la suma de las fracciones de alto y medio contenido de RNA” (Alonzo, 2013 , pág. 67).

Las investigaciones realizadas al respecto indican que la Fracción inmadura de reticulocitos es clínicamente útil como un índice temprano y sensible de la actividad eritropoyética. En casos de reticulocitopenia es importante para identificar la regeneración temprana de la médula ósea luego de trasplante de médula ósea o quimioterapia. La presencia de reticulocitos inmaduros con alto contenido en RNA también refleja la respuesta al tratamiento de anemias nutricionales, pues precede al incremento en el recuento absoluto de estas células. Puede utilizarse también para evaluar eritropoyesis inefectiva y para diferenciar entre anemia megaloblástica o mielodisplasia, de otras causas. Un bajo recuento absoluto de reticulocitos con una baja FIR está asociado con severa anemia aplásica o falla renal, mientras que una reticulocitopenia con una alta FIR indica recuperación medular. (Alonzo, 2013)

2.3.3- Contenido de Hemoglobina en el reticulocito (CHR ó Ret-He)

Este parámetro da una idea del hierro que puede ser incorporado a la hemoglobina de los eritrocitos. Un valor bajo refleja el contenido celular de hemoglobina y es útil en identificar la deficiencia funcional de hierro. Este índice es útil para detectar deficiencia funcional de hierro en estados de inflamación crónica y enfermedad renal crónica, en las cuales la ferritina suele estar falsamente aumentada como reactante de fase aguda a pesar de los depósitos de hierro bajos. Puede utilizarse también como monitoreo de la terapia con eritropoyetina y la sustitución de hierro en pacientes con insuficiencia renal.

3- DIFERENCIAS ENTRE EL CONTEO PORCENTUAL Y ABSOLUTO DE RETICULOCITOS

Básicamente, las diferencias entre los conteos absolutos y porcentuales de reticulocitos se basan en la forma de determinación. El conteo porcentual es realizado como una relación con respecto al número de hematíes, es decir mide la cantidad de reticulocitos en cada 100 células.

Por su parte el conteo absoluto mide una cifra numérica real del número de reticulocitos mediante técnicas automatizadas, y no toma en cuenta el número de eritrocitos, por lo que el conteo es más exacto y confiable.

En el paciente anémico un análisis de conteo reticulocitarios a una misma muestra puede presentar resultados distintos entre estos dos tipos de conteo, esto es debido a la manera de cuantificación de reticulocitos porcentuales.

3.1- Causas de error del conteo porcentual.

Los reticulocitos por su parte pueden presentar un valor falsamente aumentado en el conteo porcentual de los mismos (Figura 4), para esto es más confiable realizar corrección de lo reticulocitos o revisar el conteo absoluto.

Los valores porcentuales considerados normales son tomados a partir de una cuenta normal de reticulocitos y se formulan asumiendo que los reticulocitos se liberan normalmente por la médula ósea y que permanecen en la circulación por un

periodo de tiempo normal. Estas premisas no son siempre validas, en estado esto cambia totalmente y puede brindar resultados incorrectos.

En este caso se debe realizar una corrección de reticulocitos a partir de un índice de producción del reticulocito, donde se debe toman en cuenta la severidad de la anemia y vida media del hematíe.

Esta serie de cálculos muchas veces puede verse afectada por el error humano por lo que lo más recomendable es revisar una cifra absoluta. Los recuentos automatizados de reticulocitos se correlacionan bien con los recuentos manuales de estos, pero los recuentos absolutos calculados mediante fórmulas pueden diferir porque los recuentos automatizados dependen de las condiciones de la incubación y del método de calibración del instrumento.

La precisión es muy superior a la de los recuentos manuales ya que se cuentan muchas más células y se elimina el elemento subjetivo inherente al reconocimiento de reticulocitos tardíos. Los recuentos automatizados de reticulocitos son bastante estables en la sangre almacenada durante 1-2 días

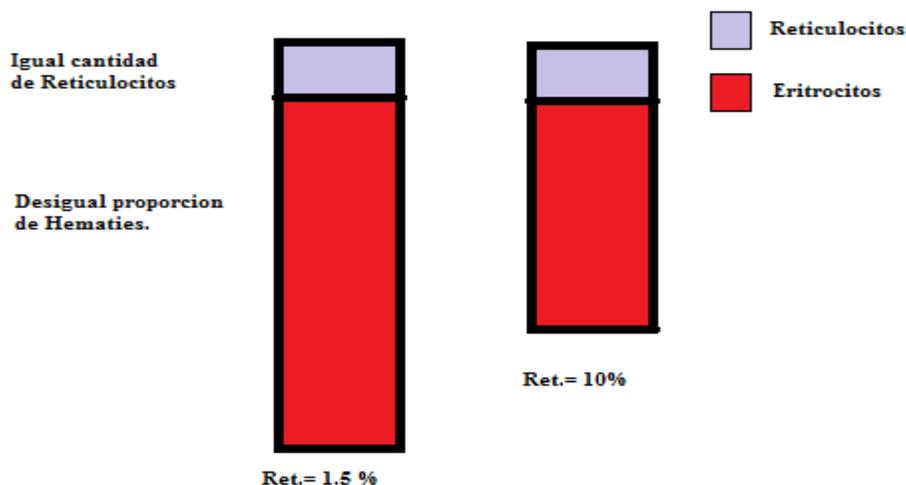


Figura 4: Causas de error en el cálculo porcentual de reticulocitos. (Fuente: Realización propia) A un número "X" de reticulocitos en una cifra de 4 millones de hematíes el valor porcentual puede ser 1.5 %, pero a un numero de hematíes de 2 millones el mismo valor "X" aumentará

4- RETICULOCITOS COMO MARCADORES DE ACTIVIDAD ERITROPYÉTICA.

Tradicionalmente, se maneja que el número de reticulocitos en sangre periférica es un reflejo bastante preciso de la actividad eritropoyética, dependiendo de este conteo pueden clasificarse las anemias como regenerativas y arregenerativas, según la capacidad de la médula ósea para regenerar el tejido hematopoyético.

4.1- Clasificación de las anemias según el conteo reticulocitarios.

- **Anemias arregenerativas**

Obedece a un defecto en la eritropoyesis, y sus causas pueden ser muy diversas y situadas en diferentes etapas de la línea madurativa eritropoyética. En este serie de anemias hay una producción incapaz de la médula por producir GR en forma adecuada para compensar la anemia, ya sea por un defecto de la misma (Ejs. anemia aplásica, leucemias) o por falta de nutrientes (hierro, vitamina B12, etc.). En este tipo de anemias la cifra de reticulocitos es normal o disminuida y el IPR es menor a 2, indicando que el origen de la anemia es a nivel central (médula ósea). (Palomo, Pereira, & Palma, 2009).

- **Anemias regenerativas**

Se caracteriza por un aumento de regeneración efectiva de la eritropoyesis como respuesta a la disminución de la concentración de hemoglobina y en general obedece a una pérdida de eritrocitos en la periferia por hemorragia o por hemolisis. En ambos casos es característico el aumento de la concentración de reticulocitos o Reticulocitosis. La hemolisis obedece a un acortamiento de la supervivencia de los eritrocitos en la circulación, y su mecanismo puede ser diverso: aumento de la destrucción fisiológica (hemolisis extravascular) o rotura de los eritrocitos en el interior de los vasos (hemolisis intravascular). Las anemias hemolíticas pueden aparecer de forma esporádica y con carácter agudo (descenso brusco del hematocrito, reticulocitosis, ictericia y orinas oscuras) o de forma crónica e intensidad variable (anemia moderada, reticulocitosis, ictericia y esplenomegalia) (Sans-Sabrafen, Besses Raebel, & Vives Corrons, 2004)

4.2- Actividad eritropoyética en deficiencia de hierro.

Se conoce que usualmente en la deficiencia de hierro existe una marcada incapacidad de regenerar el tejido hematopoyético, esto es evidenciado por un número disminuido de reticulocitos, por esto se dice que en estado deficiente de hierro hay una inactividad hematopoyética.

Actualmente se realizan investigaciones que están cuestionando esta tradicional teoría. La eritropoyesis involucra la interacción íntima del hierro y la eritropoyetina, la eritropoyetina es el acelerador que impulsa la eritropoyesis, el hierro es el combustible para la producción de nuevas células rojas. Cuando los dos se acoplan, la producción celular roja incrementa vivamente y eficazmente. Si un componente está ausente (por ejemplo, la deficiencia férrica) el resultado es Anemia. Incluso cuando ambos componentes están disponibles, ellos deben entregarse coordinadamente a la médula ósea para la acción apropiada. Por ejemplo, si el hierro llega en la escena 6 horas después que la eritropoyetina a la médula del ósea, la producción celular roja será sub-óptima.

La evidencia de la interacción entre hierro y eritropoyetina ha existido durante varios años. Por ejemplo. En algunos informes se notifica que se han realizado análisis de los niveles de eritropoyetina en estado deficiente de hierro donde se pudo extrapolar que los pacientes tenían los niveles de eritropoyetina sumamente altos (Information center for sickle cell and thalassemia disorder, 2000), esto indica que a pesar de la no regeneración eritropoyética, la médula ósea si se encuentra activada en estado deficiente de hierro.

En un estudio realizado por medio de índices madures reticulocitarios en pacientes con caída de hierro y anemia, se afirmó que se encontraron resultados contradictorios, debido que en estado deficiente de hierro se encontró un aumento de la actividad eritropoyética (Weon Choi & Hwan Pai, 2001), por su parte en un estudio de la misma índole, Wollman, et (2014) concluyo que existe un aumento de la deficiencia de hierro a causa de un aumento de la eritropoyetina en deficiencia de hierro. En medio de esta actividad hematopoyética, el único impedimento a la nueva producción de las células rojas era su deficiencia férrica. Cuando los dos

componentes converge, hierro y ferritina, la actividad de médula de hueso surge tremendamente (Information center for sickle cell and thalassemia disorder, 2000), por lo que no puede afirmarse que la médula ósea se encuentra en estado de completa inactividad.

5- RELACIÓN ENTRE DIAGNÓSTICO DE LA DEFICIENCIA DE HIERRO E ÍNDICES RETICULOCITARIOS.

5.1- AVISTAMIENTO GENERAL A LAS ANEMIAS

La anemia es un trastorno en el cual el número de eritrocitos (y, por consiguiente, la capacidad de transporte de oxígeno de la sangre) es insuficiente para satisfacer las necesidades del organismo. Las necesidades fisiológicas específicas varían en función de la edad, el sexo, la altitud sobre el nivel del mar a la que vive la persona, el tabaquismo y las diferentes etapas del embarazo. Se cree que, en conjunto, la carencia de hierro es la causa más común de anemia, pero pueden causarla otras carencias nutricionales (entre ellas, las de folato, vitamina B12 y vitamina A), la inflamación aguda y crónica, las parasitosis y las enfermedades hereditarias o adquiridas que afectan a la síntesis de hemoglobina y a la producción o la supervivencia de los eritrocitos. (OMS, 2012)

La anemia es la causa más frecuente de consulta hematológica, afecta a un 30% de la población mundial de todas las edades y clases sociales, es cuatro veces más frecuente en la mujer que en el hombre. Las mujeres presentan una cresta en la edad fértil. Más de la mitad de las anemias son debidas a deficiencia de hierro y alrededor de un tercio a déficit de folato o vitamina B12 (Palomo, Pereira, & Palma, 2009), Se caracteriza por síntomas generales y específicos, relacionados con la afección subyacente, la cual puede ser de origen congénito o adquirido.

La definición en el ámbito diagnóstico más aceptada de anemia es la propuesta por la Organización Mundial de la Salud (OMS), que es basada en la concentración de hemoglobina (Hb), donde se define como anemia a la reducción de la concentración de hemoglobina y del número de eritrocitos por debajo de los límites considerados como normales, según el sexo, la edad y la altitud del lugar de residencia, de esta

forma cuando la concentración de Hb está por debajo de los valores normales se deduce que hay anemia. (Tabla 1)

Tabla 1: Concentraciones de hemoglobina para diagnosticar anemia al nivel del mar (g/l)± , (Adaptado de OMS, 2012, pág. 2)

población	-----Anemia-----			
	Sin anemia	Leve ^a	moderado	severo
Niños 6-59 meses	110 o superior	100-109	70-99	< 70
Niño 5- 11 años	115 o superior	110-114	80-109	< 80
Niños 12-14 años	120 o superior	110-119	80-109	< 80
Mujeres no embarazadas (15 años o mayores)	120 o superior	110-119	80-109	< 80
Mujeres embarazadas	110 o superior	100-109	70-99	< 70
Varones (15 años o mayores)	130 o superior	100-129	80-109	< 80

a- Leve es inadecuado, pues la deficiencia de hierro ya está avanzada cuando se detecta

5.1.1- Clasificación

Desde el punto de vista clínico, se utilizan dos clasificaciones: morfológica y fisiopatológica.

Para la clasificación de la anemia se utilizan parámetros cinéticos y morfológicos que agrupan de distintas formas a las anemias desde diferentes perspectivas

- **Clasificación morfológica**

Se basa en la medición de los índices eritrocitarios: volumen Corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM) y la concentración media de hemoglobina globular (CHCM). (Jaime & Gomez, 2009)

Normocítica normocrómica (VCM y HCM normales)

En este grupo se encuentra la anemia con eritrocitos de tamaño y color normal, dentro las que se pueden destacar la anemia por hemorragia aguda, las anemias hemolíticas y la anemia por falla de la médula ósea.

Microcítica hipocrómica (VCM, HCM y CHCM bajos)

Las Anemias Microcíticas son caracterizadas por la producción de eritrocitos pequeños en comparación a lo normal. El pequeño tamaño de estas células es debido a la disminución de hemoglobina, el principal constituyente de los glóbulos rojos. (DeLoughery, 2014), esta misma es la causa de la hipocromía.

Entre estas se destacan la anemia por deficiencia de hierro (anemia ferropénica), la talasemia y el saturnismo o intoxicación por plomo.

Macrocítica normocrómica (VCM alto y HCM o CHCM normal)

Se trata de eritrocitos de tamaño más grande a lo normal pero de color normal. El mejor ejemplo de este grupo corresponde a la anemia megaloblástica. En ocasiones, la mielodisplasia, la hemólisis crónica y la anemia aplásica presentan este tipo de índices eritrocitarios. (Jaime & Gomez, 2009)

- **Clasificación fisiopatológica**

La clasificación fisiopatológica de las anemias se basa en la respuesta de la médula ósea para compensar la anemia, así se les clasifica en dos grupos: anemias arregenerativas y anemias regenerativas. (Palomo, Pereira, & Palma, 2009)

5.2- ANEMIA FERROPENICA

La deficiencia de hierro se define como la disminución en el contenido del hierro total en el organismo, y su etapa final, la anemia por deficiencia de hierro o anemia ferropénica (AF), constituye un problema de salud pública, sobre todo en países en vías de desarrollo; es también la carencia nutricional más común en el mundo.

5.2.1- Intercambio del hierro y utilización de los depósitos

En la figura 1 se esbozan las principales vías de intercambio interno del hierro en los seres humanos. Este metal, absorbido del alimento o liberado desde los depósitos, circula en el plasma unido a la transferrina, la proteína transportadora de hierro. La transferrina es una glicoproteína bilobulada con dos lugares de unión para el hierro. Dado que la inmensa mayoría del hierro que transporta la transferrina se entrega a la médula ósea, lo que más afecta al tiempo de depuración del hierro

embargo las mismas propiedades que lo hacen útil le proporcionan características tóxicas cuando se encuentra en exceso.

El hierro libre puede generar radicales libres que dañan componentes biológicos esenciales (lípidos, proteínas y DNA). Para regular una posible alteración en los niveles de hierro, el organismo debe ser capaz de estimar cuándo existe un déficit o un aumento de hierro, el que será controlado principalmente a través de la absorción de hierro, más que a través de su excreción. Una respuesta inapropiada o una carencia de respuesta conducirán a una anemia o a una sobrecarga de hierro. En medios biológicos el Fe se distribuye principalmente asociado a proteínas (60-70% en hemoglobina, 10% en mioglobina, citocromos y otras enzimas que contienen Fe y 20-30% en proteínas de almacenamiento como ferritina y hemosiderina en el sistema retículoendotelial y células parenquimatosas hepáticas. Los requerimientos en el ser humano son a nivel de elemento traza, diario se absorben desde la dieta 1-2 mg y se excreta la misma cantidad de este ion.

5.2.3- Diagnóstico de la deficiencia de hierro

El diagnóstico de la deficiencia de hierro es realizado en tres etapas que facilitan al clínico concretizar la presencia de la mismo, estos son el estudio de la historia Clínica, Examen Físico y Estudio de laboratorio.

La historia Clínica del paciente incluyendo sus signos y síntomas, logra revelar indicios importantes acerca del motivo de la anemia. La información solicitada por el médico debe contener los hábitos dietéticos, mediciones tomadas, posible exposición a sustancias químicas, o toxinas y posible duración de la toma. La queja más común es la fatiga, se desarrollara debilidad muscular y cuando no hay suficiente oxígeno disponible que queme combustible para la producción de energía. (McKenzie, 2000)

5.2.3.1- Estudio de laboratorio

Primeramente es importante recordar que el diagnóstico de anemia en general, se consigue verificando un valor disminuido de hemoglobina, no obstante este criterio es demasiado superficial en cuanto a la verificación del tipo de anemia con que se

enfrenta. Es importante definir el tipo de anemia ya que con esto se procede a medicar el tratamiento adecuado

Es importante hacer un planteamiento razonado de cada paciente y efectuar un uso eficiente de las pruebas complementarias. Los estudios complementarios básicos y, a menudo, suficientes, incluyen un hemograma, el examen del frotis de sangre periférica y los parámetros bioquímicos del metabolismo de hierro (sideremia, ferritina, transferrina, índice de saturación de la transferrina). (Hernandez, 2012)

Actualmente los sistemas analíticos bien estandarizados y sometidos a un riguroso control de calidad, ofrecen valores hematológicos de exactitud y reproducibilidad dentro de los límites clínicamente útiles, tanto para el diagnóstico de las anemias como para el seguimiento de su evolución y el control del tratamiento.

Las pruebas utilizadas para el diagnóstico de la deficiencia de hierro incluyen:

- **Recuento de reticulocitos.**

Los reticulocitos son los hematíes más jóvenes en circulación (con restos de ARN). Después de los primeros meses de edad, su valor normal permanece ya estable alrededor del 1,5%. Es útil en el diagnóstico de la deficiencia de hierro para acercarse al diagnóstico, así, si el resultado es una cifra disminuida de reticulocitos existen muchas probabilidades de ser causada por deficiencia de hierro. El análisis de reticulocitos no puede inferir un diagnóstico definitivo de deficiencia de hierro.

- **Recuento de Glóbulos rojos, Hematocrito y Hemoglobina:**

Estos tres parámetros proporcionan información inicial de mucha importancia para llegar a un diagnóstico certero de las anemias, indirectamente llegar a presentar manifestación inducidas por la deficiencia del mineral, estas manifestaciones no son exclusivas para la deficiencia de hierro, por lo que dichas pruebas son útiles solamente en el inicio del estudio.

- **Constantes corpusculares**

Son obtenidos a mediante Hb, Hto y conteo de G.R. brindan acerca del tamaño de los eritrocitos, útil para establecer una primera orientación. Asimismo, permite la

puesta en marcha de las exploraciones complementarias necesarias para realizar el diagnóstico diferencial. (Sans-Sabrafen, Besses Raebel, & Vives Corrons, 2004)

Tabla 2: Límite inferior (-2DE) de Valores hematológicos en niños y adolescentes en sangre periférica

Edad	Hto. (%)	GR (millones/μl)	VCM (fl)	HCM(pg)	CHCM (g/dL)
6-24 meses	33	3.7	70	23	30
2-6 años	35	3.9	75	24	31
6-12 años	35	4.0	77	25	31
12-18 años	36	4.1	78	25	31
	37	4.5	78	25	31

Adaptado de Nathan & Osby (1993), pag. 353. y Hernandez (2012), pag. 358.

En la anemia ferropénica existe un descenso de estos parámetros por debajo de su valor normal (Tabla 2), es decir, una anemia deficiente de hierro es de tipo microcítica hipocrómica, arregenerativa debido que no hay suficiente hierro para fabricar la hemoglobina, por lo tanto la hemoglobina que adquiere cada eritrocito en la medula osea es de menor proporción, pero aun así, La microcitosis no es exclusiva de la deficiencia de hierro, también se puede apreciar en otras condiciones en las que existe un defecto de la hemoglobinización de los precursores eritroides como en los casos de talasemia, infección o inflamación crónica, intoxicación plúmbica, anemias sideroblásticas. Etc (figura 5), por lo tanto a esta escala el estudio de la deficiencia de hierro concurre como presuntivo.

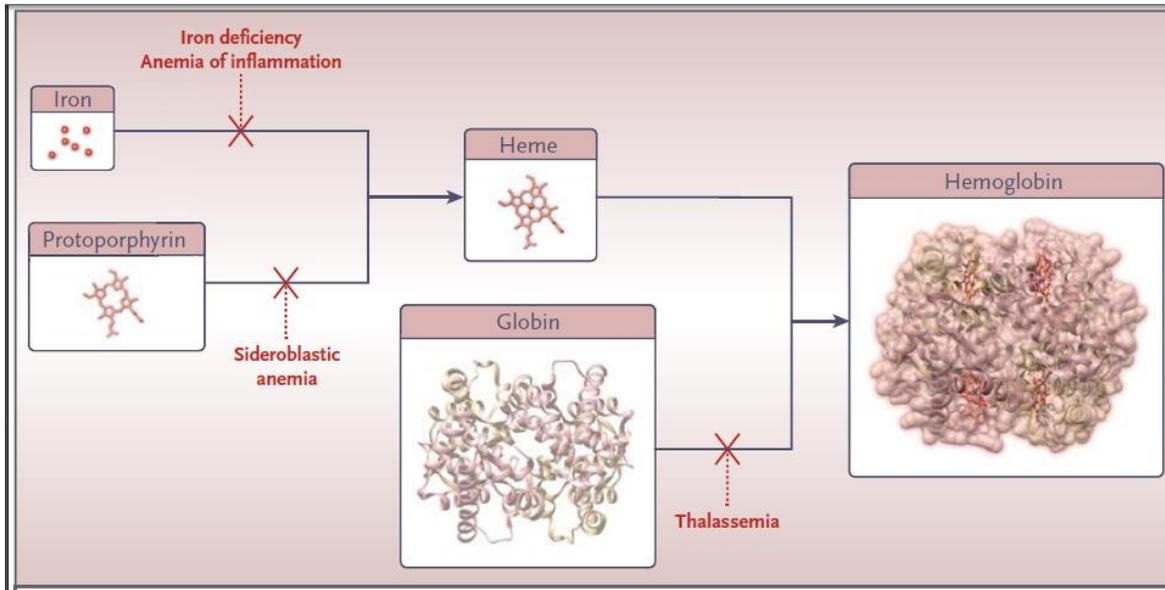


Figura 5: Causas generales de Microcitosis. (DeLoughery, 2014, pág. 7), el hierro se une a la protoporfirina para la formación del grupo hemo, el grupo hemo junto a moléculas de globina da lugar a la hemoglobina. Cualquier disminución o ausencia de alguno de los elementos necesarios para la formación de la hemoglobina, material crudo del eritrocito, causan microcitosis del mismo.

Hierro y Ferritina

En la deficiencia de hierro suele encontrarse valores de hierro en suero por debajo de lo normal, sin embargo cuando la deficiencia de hierro empieza los valores del mineral y de la hemoglobina misma se encuentran en cifras normales. Al empezar la deficiencia el hierro que se necesita para la fabricación del grupo hemo es compensado desde la ferritina almacenada en los tejidos, es decir la ferritina disminuye desde el momento que inicia la ferropenia, por lo tanto este valor la medición de ferritina es un valor de mayor peso en diagnóstico de la deficiencia de hierro (Tabla 3), Su concentración es directamente proporcional al contenido de hierro de los depósitos y sólo se encuentra reducida en la deficiencia de hierro. Sin embargo, la ferritina sérica es un reactante de fase aguda por ello aumenta en la inflamación/infección aguda o crónica. También se encuentra aumentada en la necrosis hepática. (Palomo, Pereira, & Palma, 2009)

Para realizar una determinación de ferritina es necesario saber que en condiciones normales circula una pequeña cantidad de ferritina en el plasma que se cuantifica por medio de una técnica de ELISA.

Tabla 3. Estadios en el desarrollo de deficiencia de hierro. (Lewis, Baian, & Bates, 2007, pág. 57)

	Normal	Anemia por Deficiencia de Hierro			
		Pre latente	Latente	Temprana	Tardía
Hierro en médula ósea	Normal	Disminuida	Ausente	Ausente	Ausente
Ferritina Sérica	Normal	Disminuida	< 12	< 12	< 12
Saturación de Tr.	Normal	Normal	< 17%	< 17%	< 17%
Protoporfirina eritrocitaria	Normal	Normal	Aumentada++	Aumentada++	Aumentada++
Hb.	Normal	Normal	8-14	8-14	< 8
VCM	Normal	Normal	Normal	Normal	< 80
HCM	Normal	Normal	< 27	< 27	< 27

5.3- Impacto del análisis reticulocitario en la deficiencia de hierro.

5.3.1- Determinación del estatus regenerativo o arregenerativo de la anemia.

El conteo reticulocitario juega un papel primordial en el acercamiento hacia el diagnóstico de la deficiencia de hierro, en ausencia o disminución del ion hierro la medula osea no producirá suficiente hemoglobina para la fabricación de nuevos glóbulos rojos, por lo que la población de estos decrece.

Este índice es un indicador de la actividad eritropoyética de la medula osea. Así, una anemia con reticulocitos elevados puede tratarse de hemorragia, hemolisis o la instauración reciente de un tratamiento de reposición por déficit de hierro. Por el contrario, una anemia con reticulocitos bajos indica una respuesta subóptima de la medula osea por aplasia, infiltración, depresión de la eritropoyesis por infección o la acción de tóxicos o, finalmente, deficiencia de eritropoyetina. (Hernandez, 2012), y

5.3.2 Comportamiento del conteo reticulocitario en la deficiencia de hierro.

Los reticulocitos valoran la producción de eritrocitos en la medula osea. Cuando los eritroblastos pierden el núcleo, se transforman en reticulocitos y se liberan a la sangre periférica, donde permanecen 48 h como tales antes de convertirse en eritrocitos maduros. Se acepta como cifra normal una entre 0.5 y 1.5%, o una cifra de conteo absoluto de 0.030-0.100 millones por microlitro de sangre.

Esta cifra nunca se verá afectada en un estadio latente de la deficiencia de hierro, dado a que el organismo no produce la suficiente hemoglobina para producir hematíe en grandes cifras, por lo que la cifra de reticulocitos en circulación no aumentara. Esta cifra empieza a aumentar únicamente cuando se está pasando por un proceso de recuperación a la deficiencia.

5.3.3- Índices de Maduración reticulocitarios y fracción Inmadura del reticulocito en deficiencia de Hierro.

Los índices de maduración reticulocitarios dan una noción acerca del estado de maduración del reticulocito, esto puede considerarse como una corrección al conteo, ya que brinda información adicional acerca de la actividad de la médula ósea.

Estudios recientes demuestran que existe una disminución de la madures de los reticulocitos en anemia ferropénica, debido a que la anemia provoca un estímulo eritropoyético adicional que facilita una salida precoz de reticulocitos desde la médula a la sangre, aunque el número de estos reticulocitos se encuentre limitado a la pobre producción de hemoglobina, y un acortamiento de su período de maduración intramedular y un aumento del período de maduración periférica. Este fenómeno conocido en la práctica convencional como “desviación reticulocitaria” o shift se caracteriza típicamente por la presencia de macrocitos policromatófilos en un frotis de sangre periférica. En una lámina teñida con azul de crecil, se debería observar a reticulocitos con mucho contenido reticulofilamentoso.

Sin embargo, este fenómeno está sujeto a la experiencia y al elemento subjetivo del analista, quien puede tener en cuenta que la policromatofilia de un frotis puede estar ligada a la calidad de la tinción. Además en la lectura de un frotis con azul de crecil se reporta únicamente el porcentaje de reticulocitos y no se toma en cuenta la cantidad del contenido reticular.

Los equipos automatizados dan la oportunidad de eliminar el elemento subjetivo, y ofrecen una cifra exacta sobre esta “desviación reticulocitaria” mediante la cuantificación del ARN reticular, y dan una noción más precisa de la actividad de la

medula osea, que al analizarse junto al conteo reticulocitario dan un acercamiento más preciso al estudio de la deficiencia de hierro.

5.3.4- Contenido de Hemoglobina reticulocitario y deficiencia de Hierro.

Este parámetro proporciona una medida directa de la hemoglobina presente en los reticulocitos nuevos en sangre periférica. Valores de CHr menores a 26 pg indican una inadecuada disponibilidad de hierro para una óptima eritropoyesis.

El hierro causa una pobre producción de hemoglobina, esta hemoglobina es utilizada para crear nuevos eritrocitos y la síntesis de hemoglobina empieza a darse desde los primeros precursores eritropoyéticos hasta el reticulocito, por lo que un contenido de la concentración de hemoglobina reticulocitaria aporta valiosa información en el acercamiento al diagnóstico de anemia ferropénica.

IV- DISEÑO METODOLÓGICO.

1.1- Tipo de estudio:

Transversal, Analítico de casos y controles

1.2- Área de estudio:

Colegio público Tenderí, ubicado en el municipio de Nindirí, Masaya.

Laboratorio Clínico del Hospital Manuel de Jesús Rivera La Mascota

1.3- Universo y muestra

Debido a la naturaleza analítica no descriptiva del estudio el universo es igual la muestra, la cual fue dividida en dos grupos:

Grupo	n
Casos	45
Controles	45

1.4- Criterios de inclusión para la selección de los grupos.

Casos:

Pacientes con datos clínicos o de laboratorio sugerente a Anemia Ferropénica que cumpla con los siguientes criterios:

- Sujetos en edad pre-escolar (2-6 años)
- independiente del sexo
- sugerente de anemia ferropénica, presentando Hemoglobina disminuida (< 11mg/ dl) como prueba de tamizaje.
- Ferritina disminuida como prueba confirmatoria (<12 ng/ml) (WHO, 2011)
- No estar tomando tratamiento con hierro u otra vitamina
- Padres de familia de acuerdo a que el sujeto sea participe del estudio

Controles

Pacientes sin datos clínicos ni de laboratorio sugerente a Anemia Ferropénica; cumpliendo con los siguientes criterios:

- Niños en edad escolar (2-6 años)
- Independiente del sexo
- No sugerentes de Anemia Ferropénica a través de la prueba de Tamizaje (Hb >11 mg/dl)
- Valores de Ferritina normales.
- No estar tomando tratamiento con hierro u otra vitamina
- Padres de familia de acuerdo a que el sujeto sea participe del estudio

1.5- Tipo de muestreo:

Bietápico- por conveniencia

Bietápico debido a que la muestra (Casos y controles) se seleccionó en dos unidades iniciales, el colegio público Tenderí y laboratorio Clínico del Hospital Manuel de Jesús Rivera LA MASCOTA, donde todos los participantes tienen iguales posibilidades de pertenecer al grupo “Casos” y al grupo “Controles”.

Por conveniencia debido a que las unidades iniciales de muestreo se seleccionaron para captar una mayor cantidad de pacientes sanos (CPT) y pacientes anémicos (HMJRM)

1.6- Aspectos Éticos de la investigación:

Para llevar a cabo el estudio, este primeramente fue aprobado por el comité de Investigación del departamento de Bioanálisis Clínico del Instituto politécnico de la salud en la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN Managua).

El diagnóstico de la deficiencia de hierro para formar los grupos fue realizado mediante pruebas de laboratorio, los valores de referencia fueron establecidos mediante revisión bibliográfica de informes publicados por la organización mundial

de la salud, Comité Nacional de Hematología de Argentina y sociedad española de pediatría. Estos valores se exponen en la siguiente tabla.

Parámetros y valores de pruebas utilizados para diagnosticar anemia y deficiencia de hierro. Adaptado de (OMS, 2012), (Comité Nacional de Hematología, 2009), (Sociedad española de Pediatría, 2012) y (WHO, 2011)

Tipo de Prueba	Parámetro	Valor referido	Indicador
Pruebas Screening	Hemoglobina	≤ 11 g/dL	Baja
		> 11 g/dL	Normal
	Hematócrito	≤ 35 %	Baja
		> 35 %	Normal
	Recuento G.R	4 -6 mills. /mm ³	Normal
		≤ 4-6 mills. /mm ³	Bajo
	VCM	<75 fl	Bajo
		>75 fl	Normal
	HCM	< 24 pg	Bajo
		> 24 pg	Normal
	CHCM	< 31 g/dL	Bajo
		> 31 g/dL	Normal
ADE	> 14 %	Aumentado	
	12-14 %	normal	
Prueba confirmatoria	Ferritina	< 12 ng/mL	Bajo
		>12 ng/mL	normal

1.7-Etapa pre- muestreo

Se solicitó autorización a la delegación MINED del municipio de Nindirí para realizar un muestreo, posterior a la autorización se reunió a padres/ tutores de niños del colegio público Tenderí, Nindirí, para plantearles los objetivos del estudio y los criterios necesarios para participar en este. Los padres o tutores que estuvieron de

acuerdo firmaron una forma de consentimiento informado después de explicado los procedimientos del estudio.

Se solicitó la autorización a la responsable del laboratorio clínico del hospital Manuel de Jesús Rivera la Mascota Lic. Agustina Canales, para proceder utilizar muestras de pacientes no ingresados con resultado sugerente a anemia en la BHC. Estas muestras ya habían sido utilizadas para fines diagnósticos en el laboratorio y estaban destinadas a ser descartadas.



Reunión con padres de familia, colegio público Tenderi

1.8- Muestreo

En el colegio público Tenderí se realizó un muestreo donde se recolectaron dos muestras de sangre mediante punción venosa por cada participante usando tubos que contienen EDTA como anticoagulante, y en tubos que no contienen EDTA para la obtención de Suero.

Se trasladaron las muestras procedentes de ambas unidades en estudio hacia el Hospital Salud Integral en condiciones de baja temperatura para la realización de las BHC, en un lapso no mayor a 6 horas para su análisis.

Las muestras sin anticoagulante fueron llevadas en iguales condiciones al laboratorio de Biología molecular del instituto Politécnico de la Salud, donde se realizó la separación del suero del paquete celular. En este mismo lugar se conservaron las muestras en refrigeración para su posterior análisis.

1.9- Análisis de laboratorio.

Para realizar el análisis de las BHC (que contiene valor de Hb e índices hematimétricos) e índices de madurez reticulocitarios se solicitó permiso a la Dra. María Gabriela Ramos, Directora Médica del Hospital Salud Integral, y a la Lic. Mildred Payan, Responsable del laboratorio de mismo centro, para la utilización del clitómetro de flujo Sismex XT 4000i.

Se realizó el análisis de reticulocitos a partir de 10 000 células analizadas mediante el principio activo de la citometría de flujo, precipitando el material ribosomal de los reticulocitos con la tinción supravital “Auramina O” (Sismex Corporation, 2012), el citómetro de flujo realiza automáticamente la dilución de la sangre con la tinción.



Citómetro de Flujo Sismex xt- 4000i

Para el análisis de la ferritina se solicitó autorización al laboratorio clínico docente del departamento de Bioanálisis Clínico para poder procesar las muestras en este lugar y utilizar de igual forma el lector de ELISA que posee este centro para la lectura de las absorbancias.

Para este cometido se trasladaron las muestras desde el laboratorio de Biología molecular, donde se encontraban almacenadas, hacia el laboratorio del departamento de Bioanálisis Clínico donde fueron descongeladas y procesadas.

Se Utilizó un kit ELISA de tipo Sándwich bajo el principio Streptavidina-Biotina para el análisis cuantitativo de ferritina en suero y plasma del fabricante CALBIOTECH, realizando la lectura a una longitud de onda de 450 nm. El fabricante indica que las absorbancias obtenidas son directamente proporcional a la ferritina contenida en la muestra, su concentración cuantitativa fue calculada a partir de una curva de calibración partiendo de estándares incluidos en el kit.



Kit Utilizado para las pruebas ELISA

1.10- Análisis, procesamiento y presentación de los Datos

Todos los datos estadísticos fueron generados de manera computarizada mediante el software “Statistics Package for the Social Sciences” SPSS versión 20.0, donde se creó una base de datos previamente.

Se realizó en una primera etapa análisis estadísticos descriptivos de grupo, posteriormente en una segunda etapa se realizaron pruebas inferenciales para realizar al análisis del estudio. En esta etapa se realizó la prueba de “Kolgomorov-Smirnoff” con la finalidad de evidenciar la manera en que se encontraban distribuidas los datos de las variables que necesitaban compararse y clasificarlas en “Normales y no Normales”. La comparación de medios fue realizado mediante la prueba paramétrica “t-student para muestras independientes” en el caso de las variables que presentaron distribución normal, en caso contrario se realizó la prueba no paramétrica “U de Mann-Whitney para muestras independientes”

Todas las pruebas realizadas por el software fueron ejecutadas con un margen de confianza del 95 %. El criterio utilizado para definir distribución normal en la prueba de Kolgomorov-Smirnoff y diferencias estadísticamente significativas en los test de diferencias de medias fue un p-valor menor o igual a 0.05.

Para la realización del Informe final se utilizó el programa Microsoft Word Versión 2013, los gráficos presentados fueron generados en conjunto mediante los programas SPSS y Microsoft Excel para su posterior presentación en el programa Microsoft Power Point versión 2013

2- Operacionalización de variables.

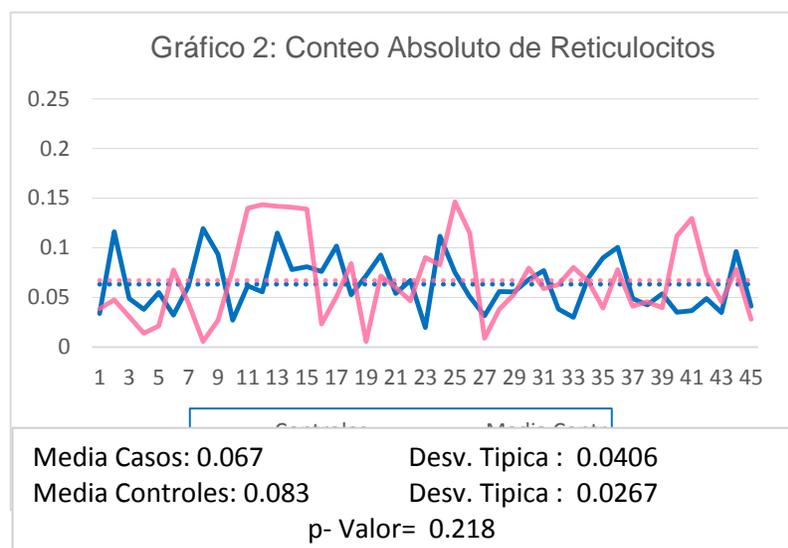
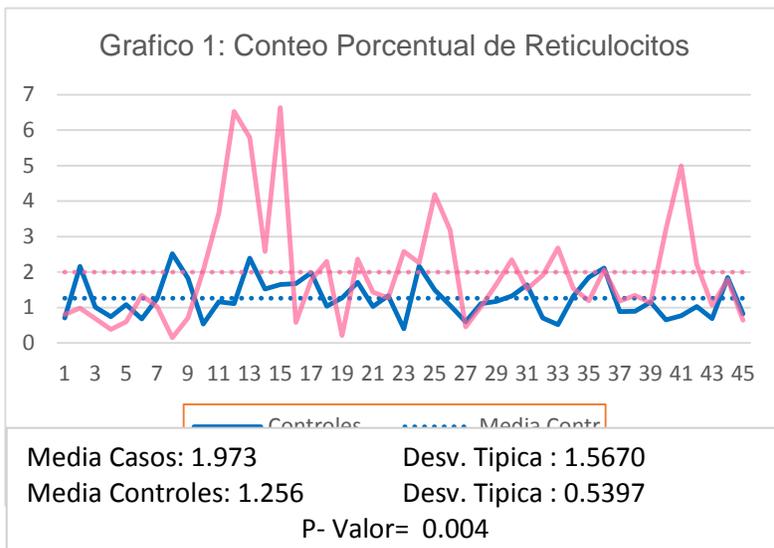
Variable	Sub-Variable	Indicadores	Valores	Criterios	
Resultado entre el conteo porcentual y absoluto	Conteo	Conteo casos	< 1.5 %	Normal	
	Porcentual	Conteo controles	< 1.5 %		
			Conteo casos	< 1.5 %	Discrepante
			Conteo controles	> 1.5 %	
		Conteo	Conteo casos	$0.030-0.100 \times 10^6$	Normal
		Absoluto	Conteo controles	$0.030-0.100 \times 10^6$	Discrepante
			Conteo casos	$0.030-0.100 \times 10^6$	
			Conteo controles	$> 0.100 \times 10^6$	
Actividad Hematopoyética en deficiencia de hierro.	Actividad Hematopoyética en pacientes con deficiencia de hierro.	Fracción Inmadura del reticulocito "Grupo casos".	Valor relativo a los controles. Valor Aumentado con respecto a los controles.	Actividad Normal Actividad Aumentada	
Relación entre Pruebas Convencionales e IMR.	Relación basada en diferencias estadísticas.	Hemoglobina	p- valor < 0.05	Significativo	
			p- valor > 0.05	No Significativo	
		Hematócrito	p- valor < 0.05	Significativo	
			p- valor > 0.05	No Significativo	
		Recuento G.R	p- valor < 0.05	Significativo	
			p- valor > 0.05	No Significativo	
		VCM	p- valor < 0.05	Significativo	
			p- valor > 0.05	No Significativo	
		HCM	p- valor < 0.05	Significativo	
			p- valor > 0.05	No Significativo	
		CHCM	p- valor < 0.05	Significativo	
			p- valor > 0.05	No Significativo	

Variable	Sub-Variable	Indicadores	Valores	Criterios
Relación entre Pruebas Convencionales e IMR.	Relación basada en diferencias estadísticas.	Ferritina	p- valor< 0.05	Significativo
			p- valor> 0.05	No Significativo
		HRF	p- valor< 0.05	Significativo
			p- valor> 0.05	No Significativo
		MRF	p- valor< 0.05	Significativo
			p- valor> 0.05	No Significativo
		HRF	p- valor< 0.05	Significativo
			p- valor> 0.05	No Significativo
		relación Ret- Hb	p- valor< 0.05	Significativo
			p- valor> 0.05	No Significativo
		IRF	p- valor< 0.05	Significativo
			p- valor> 0.05	No Significativo

V- RESULTADOS

1- Diferencias entre los valores porcentual y absoluto con respecto al conteo reticulocitario mediante citometría de flujo.

En los siguientes gráficos se disponen cada uno de los valores obtenidos del conteo porcentual y absolutos, mostrando el comportamiento que existe entre ambos grupos.



Fuente: Resultados estadísticos de Grupo SPSS/ Base de datos

En las gráficas se plasman en cada uno de los picos los valores individuales del conteo reticulocitarios absoluto y porcentual tanto de los casos como de los controles. Se traza de igual forma la media de cada grupo, que permite tener una noción de la forma en que se distribuyen los datos.

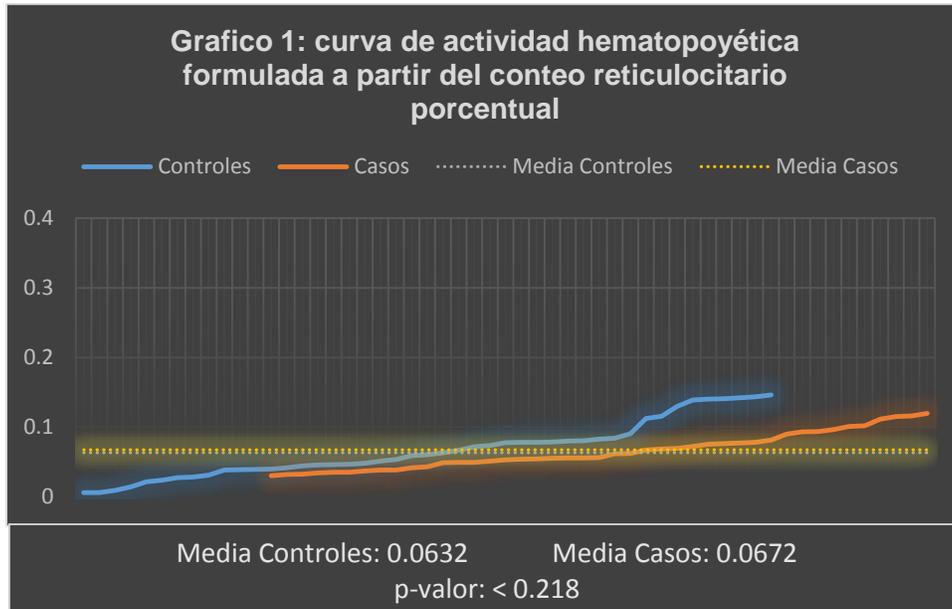
Existe una amplia dispersión entre los valores del conteo reticulocitario porcentual, que pueden observarse en la línea de dispersión, algunos datos del conteo del grupo de los pacientes ferropénico presentan cifras de reticulocitos que sobrepasan el 6%. La desviación típica a la vez reafirma que el conteo porcentual de los pacientes ferropénico presenta una dispersión muy amplia, a diferencia del grupo control que presenta una dispersión más uniforme.

La grafica del conteo absoluto muestra valores relativamente similares entre ambos grupos, puede notarse que el valor de la media entre ambos grupos presentan

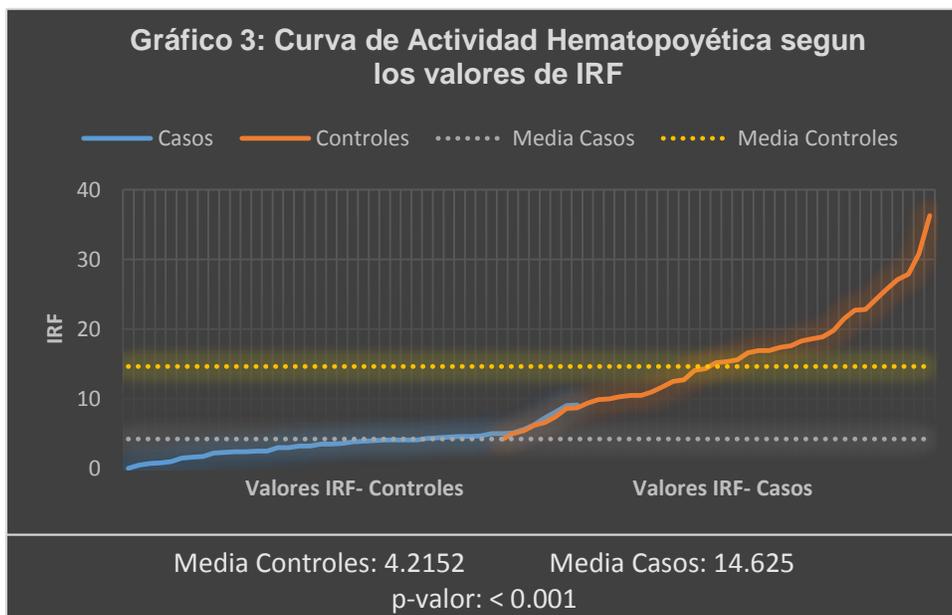
valores cercanos entre sí, las líneas de las medias en el grafico consecuentemente se disponen en ubicaciones relativamente igual, además el valor de la desviación típica sugiere que existe uniformidad de los datos entre ambos Grupos.

2- Comportamiento de activación hematopoyética medular en estado deficiente de hierro.

Las siguiente graficas están conformada por los valores del conteo absoluto reticulocitario y fracciones inmaduras de reticulocitos de casos, y muestran una nocion grafica de la actividad medular.



Fuente: Base de Datos/Estadísticos descriptivos/ prueba t-student



Fuente: Base de Datos/Estadísticos descriptivos/ prueba t-student

Las presentes curvas están conformadas por los valores del conteo absoluto reticulocitario y fracciones inmaduras reticulocitarias de controles y casos, se disponen de mayor a menor por cada grupo, brindando una noción grafica del proceso de activación medular.

En la gráfica 3 se observan que los valores del conteo absoluto de reticulocitos expresados en millones por microlitro de sangre, el menor valor del conteo del grupo control es cercano a cero y se extiende a su valor más alto cerca de 0.15, el grupo ferropénico muestra una curva constante que se extiende desde el punto más bajo cercano a 0.03 hasta un punto cercano a 0.15. Se representa el valor de la media de cada grupo, las cuales se disponen muy cerca la una de la otra sin mostrar ninguna diferencia estadística entre las medias.

El grafico 4 muestra los valores de las fracciones inmaduras reticulocitarias de casos y controles. El menor valor es cercano a cero en los controles e incrementa hasta acercarse al 10%, donde se entrecruza con los valores más bajos del IRF del grupo ferropénico, que se extienden hasta un poco más del 35%. Las medias entre cada grupo presentan un notable margen de diferencia, esta diferencia es estadísticamente significativa.

3- Diferencias estadísticas de las pruebas screening para identificación de deficiencia de hierro e índices de madures de los reticulocitos.

A continuación se muestran las diferencias de los resultados obtenidos entre los grupos casos y controles (Tabla 5) después de la ejecución de las pruebas designadas para diferencias de medias en muestras independientes.

Tabla 5: significancia de las diferencias para las pruebas convencionales en el diagnóstico de la deficiencia de hierro e índices reticulocitarios. $\alpha=95\%$

		Casos Media	Controles Media	p- valor
Pruebas Convencionales	Edad	3.38	3.73	0.805
	RBC	3.575	5.052	< 0.001
	HB	9.286	13.18	< 0.001
	HCT	29.99	40.54	< 0.001
	VCM	80.35	83.18	0.830
	HCM	27.22	26.17	0.913
	CHCM	32.56	35.08	< 0.001
	RDW-CV	16.45	13.41	< 0.001
	Ferritina	10.22	25.08	< 0.001
Índices de Madurez Reticulocitarios	Ret %	1.996	1.256	0.004
	Ret (x 10⁶)	0.083	0.063	0.218
	IRF (%)	0.083	4.079	< 0.001
	RET-He (pg)	19.18	32.94	< 0.001
	LFR (%)	85.46	95.87	< 0.001
	MFR (%)	11.80	3.804	< 0.001
	HFR (%)	2.72	0.3	< 0.001

Fuente: Resultados de la Prueba t-student y U de Mann Whitney

La presente tabla muestra las diferencias estadísticas encontradas entre las pruebas convencionales para el diagnóstico de hierro e índices reticulocitarios. Puede observarse diferencias gráficamente en el anexo 4. No se encontró diferencias estadísticamente significativas en las edades de los participantes. Puede notarse que existen diferencias significativas en la mayoría de las pruebas convencionales para el diagnóstico de la deficiencia de hierro, no hay diferencias en

los índices hematimétricos VCM y HCM, pero si se encontró diferencias en los niveles de CHCM. El criterio principal para el diagnóstico de la deficiencia de hierro, la ferritina, presenta diferencias significativas entre los resultados de los casos y controles.

El conteo de reticulocitos Porcentual presento diferencias, sin embargo no se encontró diferencias en el conteo absoluto de los mismos. Se encontró diferencias absolutas en todos los índices de maduración de los reticulocitos (IRF, MRF, HRF, LRF) y en el contenido de hemoglobina reticulocitaria.

VI- DISCUSIÓN

1- Diferencias entre los valores porcentual y absoluto con respecto al conteo reticulocitario mediante citometría de flujo.

Para lograr llegar a una clasificación etiológica de las anemias es necesario saber la manera en que se comporta la medula ósea frente a las condiciones que desencadenan dicha anemia. Hasta la fecha, el marcador más usual para este cometido es el conteo de reticulocitos.

Los valores obtenidos mediante citometría de flujo porcentual y absoluto fueron realizados simultáneamente a la misma muestra, el valor porcentual de los reticulocitos presenta un comportamiento normal en los pacientes control a cómo debe comportarse en condiciones normales, sin embargo en los pacientes ferropénicos se encontraron algunos valores aumentados que indican el establecimiento de una anemia de tipo regenerativa, contraponiendo lo que teóricamente se maneja con respecto al comportamiento medular.

A pesar de que la mayoría de los valores en los pacientes ferropénicos presentan valores normales, puede observarse mediante la desviación típica que el nivel de variación es grande, es decir muchos valores se alejan de los valores considerados normales.

La grafica del conteo absoluto, al contrario, muestra una distribución más equitativa entre ambos grupos, o dicho en otras palabras, expresa un comportamiento de tipo arregenerativo, presentando valores relativos a los controles, como se plantea teóricamente.

A simple vista esto puede parecer una hecho controversial, puesto que como anteriormente se mencionó estos conteos son realizados simultáneamente a una misma muestra, sin embargo un hecho indiscutible a tomar en cuenta es que el resultado expresado como valor relativo viene siempre referido a una concentración normal de eritrocitos, y nunca tiene en cuenta la salida prematura de reticulocitos desde la medula osea a la sangre (Hernandez, 2012), por esto mismo es de esperar un resultado erróneo y poco confiable en la cifra reticulocitaria.

El conteo absoluto en cambio proporciona una cifra real, pues es realizado contando directamente los reticulocitos sin tomar en cuenta el conteo eritrocitario.

Esto pone de manifiesto el bajo nivel de exactitud que posee el conteo porcentual de eritrocitos para determinar la cifra de los mismos en situaciones donde el número de eritrocitos esta disminuido, como el caso de la deficiencia de hierro.

Una misma cifra de reticulocitos puede variar al realizar una relación porcentual entre diferentes cifras de hematíes, es decir en un número menor de hematíes el valor de reticulocitos aumentara falsamente, y en un número mayor de eritrocito la misma cifra disminuirá, pues este conteo no mide la cantidad existente en una muestra si no la relación porcentual que existe en un determinado número de hematíes, es decir el número de reticulocitos por cada 100 eritrocitos.

En estos casos es más confiable revisar un conteo absoluto de reticulocitos, el cual será el mismo sin importar si el número de eritrocitos es normal o disminuido. Otra alternativa en caso de no poseer el conteo absoluto sería realizar una corrección del conteo.

2- Comportamiento de activación hematopoyética medular en estado deficiente de hierro.

Teóricamente se maneja que no existe un estado de actividad medular hematopoyética en deficiencia de hierro. Tomando en cuenta únicamente el conteo reticulocitario absoluto obtenido de los pacientes ferropénicos con respecto a los pacientes sanos, el estado deficiente de hierro muestra una ausencia de actividad medular.

Contrariamente se encontró un incremento de la inmadurez de los reticulocitos en estado deficiente de hierro, esto puede observarse en las diferencias de las cifras de los índices de maduración de ambos grupos, específicamente la fracción inmadura del reticulocito (IRF).

Aunque las aplicaciones de los índices de maduración reticulocitarios sean objeto de múltiples investigaciones y tengan una utilidad limitada, un hecho que no se discute es que estos dan un claro indicio de actividad medular (Alonso, 2013). Se ha sabido durante mucho tiempo que el estado deficiente de hierro es una condición en la que es imposible para la medula osea regenerar y proliferar el tejido hematopoyético, sin embargo esto nos lleva a deducir que esta incapacidad de proliferación celular está limitada de la misma forma a una incapacidad de activación de la medula osea.

Según Weon Choi & Hwan Pai (2001) También se han informado este tipo de resultados contradictorios por el efecto de deficiencia férrica sobre la eritropoyesis, Wollmana 2014 afirma: “en estado anémico existe un aumento de la actividad eritropoyética por incremento de la eritropoyetina en la medula osea, aumentando la proliferación celular y maduración”. Con respecto a esto, junto al comportamiento observado de los índices reticulocitarios se propone:

Existe actividad medular en el estado deficiente de hierro aunque esta sea de tipo arregenerativo. Al encontrarse el organismo en una situación donde el número de eritrocitos para transportar oxígeno es insuficiente, se produce un estímulo para la regeneración del tejido hematopoyético mediante la eritropoyetina, este cometido

es frustrado debido a la pobre producción de hemoglobina a consecuencia del hierro deficiente en el organismo. Dicho comportamiento se pone de manifiesto al encontrar un conteo no aumentado de reticulocitos, que indica la incapacidad medular de reproducir el tejido.

Un artículo publicado por the Information center for sickle cell and thalassemia disorder (2000) afirman que en estado deficiente de hierro la médula osea se encuentra activada, las cifras de eritropoyetina en este estado son considerablemente altas, y que el fenómeno de regeneración se da casi instantáneamente cuando el hierro empieza a estar presente en el organismo. Este fenómeno de regeneración como respuesta a la ingesta de hierro puede ser logrado únicamente si la médula osea se encuentra activada.

El único impedimento a la nueva producción de las células rojas es la deficiencia férrica. Cuando los dos componentes convergen, hierro y eritropoyetina, la regeneración por parte de médula osea surge rápidamente, por lo que no puede afirmarse que la médula osea se encuentra en estado de inactividad.

3- Relación entre la deficiencia de hierro e índices de madures de los reticulocitos.

Al realizar un estudio comparacional es necesario que los grupos a comparar presenten alguna condiciones compartidas en particular, como grupos étnicos o edades. En el caso particular de la deficiencia de hierro el principal factor necesario para la realización de un estudio comparacional es la edad, debido a que en determinados grupos de edades se presenta una mayor ingesta de hierro, como en los niños.

El presente estudio no presenta ninguna diferencia estadísticamente significativa en cuanto a las edades de los pacientes, los parámetros llevados a estudio fueron realizados en una población de naturaleza similar en los que se presenta un mismo rango de edad, puede observarse que en este parámetro no se encontraron diferencias, por lo que los resultados no pudieron ser afectados de ninguna manera por influencias de esta.

Se encontraron diferencias significativas en la mayoría de las pruebas usuales en el diagnóstico de la deficiencia de hierro, como plantea la OMS y textos afines. No se encontraron diferencias significativas en los valores de la VCM y HCM, sin embargo los valores de estas pruebas empiezan a disminuir en estadios avanzados de la deficiencia de hierro (ver Tabla 3 del marco teórico), por lo que el hecho de no encontrar diferencias entre ambos grupos no descarta la probabilidad de estar en presencia de anemia ferropénica. La CHCM al medir la cantidad de hemoglobina individual de los eritrocitos empieza a disminuir en las primeras etapas de la deficiencia de hierro, en este parámetro se encontraron diferencias estadísticas significativas.

Se encontraron diferencias en todos los parámetros reticulocitarios a excepción del conteo absoluto, estas diferencias dan un claro indicio de la utilidad que presentan en al diagnóstico de deficiencia férrica.

El organismo necesita cantidades determinadas de hierro para lograr fabricar la hemoglobina que necesitan los eritrocitos, En la deficiencia de hierro, que se

visualiza encontrando concentraciones bajas de ferritina, hay una pobre producción de hemoglobina, lo que se refleja como una disminución de la hemoglobina, la cantidad de hemoglobina por eritrocito disminuirá (CHCM disminuida) y consecuentemente el volumen de los glóbulos, este es reflejado por los valores del VCM Y HCM. Este estado anémico da lugar a que la médula ósea se active para compensar la anemia y regenerar el tejido eritroide, esta activación puede ponerse de manifiesto al presentarse cambios en los valores de los IMR y disminución de la fracción inmadura del reticulocito. Sin embargo al no encontrar el hierro suficiente para la proliferación celular, la cifra de reticulocitos en sangre periférica no aumentara y se mantendrá en valores disminuidos. Por su parte esta deficiencia de hierro afecta la idónea síntesis de hemoglobina en los precursores eritroides, quienes poseerán una menor cantidad de hemoglobina para realizar esta síntesis, esto es visible al encontrar valores de hemoglobina reticulocitaria disminuida,

Los reticulocitos pueden brindar información crucial al analizarse a la par de el resto de pruebas usuales en la deficiencia de hierro, ya que indican que en esta deficiencia se encuentran un bajo número de reticulocitos en sangre periférica, los cuales tienen en su interior una disminuida concentración de hemoglobina y que a la vez presentan un alto grado de inmadurez.

Estos parámetros podrían ser aplicados en los casos donde no se realiza un paquete completa de pruebas para realizar un diagnóstico diferencial de las anemias por el costo de todas las pruebas, en Nicaragua por ejemplo, el diagnóstico de la anemia ferropénica es realizado únicamente tomando en cuenta los valores de la BHC (Zelaya Montiel, 2013)

VII – COCLUCIONES

- 1- Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los conteos absolutos y porcentuales de los pacientes, demostrando que el conteo porcentual es objeto a errores en estado anémico y deficiente de hierro.
- 2- Se evidencio un aumento de la actividad de la medula ósea en estado deficiente de hierro mediante el análisis de la fracción inmadura del reticulocitos, aun así no haya capacidad de regeneración del tejido eritrocito.
- 3- Se encontraron diferencias significativas entre los índices de maduración reticulocitarios de los casos y los controles, que probaron la relación de los mismos con la deficiencia de hierro y que estos índices pueden utilizarse junto a las pruebas convencionales para la deficiencia de hierro como un marcador confiable y precoz de dicha deficiencia.

1.1- RECOMENDACIONES

➤ **A médicos tratantes de deficiencia de hierro:**

Aplicar los índices reticulocitarios, si está al alcance del laboratorio local, para apoyarse al diagnóstico certero de dicha deficiencia.

➤ **A estudiantes e investigadores:**

Profundizar y seguir indagando a cerca del comportamiento de los parámetros reticulocitarios e índices de maduración en otros tipos de anemia como parámetros complementarios a los de la rutina diaria.

➤ **A docentes y personal de salud:**

Divulgar los resultados del presente estudio con el fin de avanzar en el conocimiento y estudio de la deficiencia de hierro

VIII -REFERENCIAS

1. Alonzo, M. (2013). Índices Reticulocitarios: Fracción inmadura de reticulocitos (FIR), Contenido de Hemoglobina de Reticulocitos (CHr). *Hematología*, 17 (1), 67-69.
2. Comité Nacional de Hematología. (2009). Anemia ferropénica. Guía de diagnóstico y tratamiento. *Sociedad Argentina de Pediatría*, 353-361.
3. DeLoughery, T. (2014, Octubre 2). Microcytic Anemia. (E. Campion, Ed.) *The new england journal o f medicine*, 1324-1331.
4. Davis, B., Dicorato, M., Bigelow, N., & Langweiller, M. (1991). Proposal for Standarization of Flow Cytometric Reticulocyte Maturity Index (IMR) Measurements. *Citometry*, 14, 318-326
- 5- Drago Serrano, M. E., Barrera Serrano, L. M., Perez Ramos, J., Zamora, A. C., Gomez Arrollo, F., Sainz Espuñes, T., & Mendoza Perez, F. (2004). citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*, XVII(1), 42-55.
6. Dubner, D., Gissone, P., & Perez, M. (1995). Reticulocyte maturity index by flow cytometry: its applicability in Radioinduced bone Marrow Aplasia. *Ente regulador Nuclear de Argentina*, 1-7.
7. Dubner, D., Perez, M. d., Barbosa, M., & Sorrentino, M. (2002). Indicadores evolutivos y de recuperacion medular en transplantes de Medula Osea despues de irradiacion corporal total. *MEDICINA*(62), 555-561.
8. Łuczyński , w., Ratomski, k., Wysocka, J., Krawczuk-Rybak , M., & Jankiewicz, J. (2006). Immature reticulocyte fraction (IRF) – an universal marker of hemopoiesis in children with cancer? *Advances in Medical Sciences*, 51, 188-190.
9. Fink, N. (2005, Enero-Abril). Automatizacion en Hematología. *Hematología*, 9(1), 4-16.

10. Hernandez, A. (2012). Anemias en la infancia y adolescencia Clasificación y Diagnóstico. *Pediatría Integral, Órgano de expresión de la Sociedad Española de Pediatría Extrahospitalaria y Atención Primaria, XVI(5)*, 357-365.
- 11- Information center for sickle cell and thalassemia disorder. (10 de mayo de 2000). *The Interaction of Iron and Erythropoietin*. Obtenido de http://sickle.bwh.harvard.edu/iron_epo.html
12. Jaime , J. C., & Gomez, D. (2009). *HEMATOLOGÍA La Sangre y sus Enfermedades* (Segunda Edición ed.). Mexico DF, Mexico: Mc Graw Hill.
13. Lewis, S., Baian, B., & Bates, I. (2007). *Practical Haematology* (Decima ed.). Barcelona: El Seiver.
14. McKenzie, S. (2000). *Hematología Clínica* (Segunda ed.). México: El Manual Moderno S.A de C.V.
15. National Committee for Clinical Laboratory Standards and. (2004). Methods for reticulocyte counting (automated blood cell counters, flow cytometry, and supravital dyes). *Approved Guideline, 24*, 8.
16. WHO. (2012). *Concentraciones de Hemoglobinas para diagnosticar anemia y evaluar su gravedad*. Retrieved from World Health Organization: <http://www.who.int>
17. Palomo, I., Pereira, J., & Palma, J. (2009). *HEMATOLOGÍA Fisiopatología y Diagnóstico*. Talca, Chile: Editorial Universidad de Talca.
18. Sans-Sabrafen, J., Besses Raebel, C., & Vives Corrons, J. (2004). *Hematología Clínica* (Quinta ed.). España.: El Seiver.
19. Sismex Corporation. (2012, Mayo). Retrieved from Sismex America Inc.: www.sysmex.com/us
20. Wollmana, M., Cerezer Gerzsonb, B. M., Schwertc, V., Weber Figuerad, R., & Ritzeld, G. d. (2014). Reticulocyte maturity indices in iron deficiency anemia. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy, 25-28*

21. Zelaya Montiel, A.(2013). Prevlencia de la Anemia en niños de 1-5 años de edad- Pediatría Hospital Alemán Nicaraguense, Ultimo trimestre 2012 (Tesis de Especialidad) UNAN-Mangua
22. Weon Choi, J., & Hwan Pai, S. (2001). Reticulocyte Subpopulations and Reticulocyte Maturity. *American Journal of Hematology Index (RMI) Rise as Body Iron Status Falls*(67), 130–135.
23. WHO. (2011). *Ferritin concentrations to evaluate the state of nutrition of the iron in the populations* . Ginebra: WHO.

IX- ANEXOS



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE NICARAGUA

INSTITUTO POLITÉCNICO DE LA SALUD

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Utilidad clínica del índice de maduración reticulocitaria en el diagnóstico de anemia por déficit de hierro en niños en edad escolar procedentes del colegio guardabarranco, Managua.

Nombres de los investigadores: Annia Karelia Rosales Avendaño.

Gerald Nicolás Vásquez Alemán.

Jarinton Enrique Ugarte Torrez.

Nombre del participante: _____

A. PROPÓSITO DEL ESTUDIO.

Nosotros, los antes mencionados, estudiantes de 5^{to} año de la licenciatura de Bioanálisis clínico de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, pretendemos valorar si los índices de maduración Reticulocitarios son útiles para diagnosticar anemia por deficiencia de hierro, puesto que son parámetros no implementados.

La población de Nicaragua históricamente ha tenido niños con problemas de la sangre como las anemias. Estos niños nacen sanos pero se vuelven anémicos en el curso de su vida que pueden ser ocasionados por una dieta baja en hierro y de no ser diagnosticados y tratados a tiempo la mayoría pueden sufrir complicaciones.

B. ¿QUE SE HARA?

Si usted y si hijo o hija aceptan participar en este estudio, se les realizara lo siguiente:

- Una entrevista sencilla la cual usted responderá, leerá cada punto de este documento y si usted está de acuerdo, se procederá a tomar una muestra de sangre a su hijo.
- Una vez tomada la muestra, se almacenara en condiciones adecuadas, hasta su procesamiento, para la determinación de pruebas: Biometría Hemática, Hemoglobina, en caso de ser sospechosos: hierro sérico, Ferritina, Índices de Madurez de Reticulocitos.

C. BENEFICIOS

Como resultado de su participación en este estudio el beneficio será obtener los resultados de los exámenes de laboratorio gratuitamente y se informara si su hijo o hija padece de Anemia para que pueda llevarlo al centro de salud más cercano.

D. RIESGOS

- El niño o niña puede presentar cierto dolor al momento de la toma de muestra.
- El niño o niña puede presentar hematomas en el sitio de la punción

E. ASPECTOS ETICOS DE LA INVESTIGACION

Antes de dar su autorización para este estudio usted deberá haber hablado con alguno de los investigadores y ellos deben haber contestado satisfactoriamente todas sus preguntas. Si desea saber

ANEXO 2: Base de datos de los resultados de las pruebas convencionales e índices de madures del reticulocito. (Grupos, 1=Controles, 2=Casos)

Codigo	Grupo	Edad (Años)	RBC (10 ⁶ x ul)	HB (g/dL)	HTC (%)	MCV(fL)	MCH (pg)	MCHC (g/Dl)	RDW-CV (%)	Ferritina ng/mL
2	1	3	4.84	12.5	38.3	79.1	25.8	32.6	13.8	17
3	1	5	5.37	14.1	42.1	78.4	26.3	33.5	13.7	32.7
7	1	4	4.82	12.8	38.2	79.3	26.6	33.5	12.7	19
9	1	3	5.14	13.1	40.3	78.4	25.5	32.5	13.1	37
10	1	2	5.09	13.7	42	82.5	26.9	32.6	13.9	26
11	1	5	4.72	12.6	39.6	83.9	26.7	31.8	13.5	24
12	1	5	4.9	13.7	41.9	85.5	28	32.7	12.3	21
17	1	6	4.74	12.6	39	82.3	26.6	32.3	13	33
19	1	3	5.1	13.5	40	78.4	26.5	33.8	14.3	14
20	1	3	5.14	13	39.9	77.6	25.3	32.6	13.8	28
21	1	2	5.32	13.7	42.2	79.3	25.8	32.5	13.5	26
24	1	2	5	12.5	39.1	78.2	25	32	13.6	41
27	1	3	4.81	12.8	39	81.1	26.6	32.8	13.2	24
28	1	3	5.13	13.1	40	78	25.5	32.8	13.7	24
29	1	4	4.9	12.6	38.5	78.6	25.7	32.7	13.1	31
32	1	2	4.56	12.6	38.6	84.6	27.6	32.6	13.5	29
33	1	4	5.12	13.9	42.1	92.2	27.1	33	12.9	27
35	1	2	5.06	13	40	79.4	25.7	32.3	13.2	15
37	1	4	5.65	14	44.7	79.1	24.8	31.3	14.3	18
39	1	3	5.43	14	43.4	79.9	25.8	32.3	13.4	29
41	1	3	5.24	13.9	42.2	80.5	26.5	32.9	14	28
42	1	3	5.04	12.6	38	75.4	25	33.2	14	25
49	1	2	4.93	12.9	39.8	80.7	26.2	32.4	12.8	13
52	1	5	5.14	12.9	39	75.9	25.1	33.1	13.2	23
53	1	4	5.04	13.2	40.7	80.8	26.2	32.4	12.7	16
55	1	5	4.79	12.5	38.2	79.7	26.1	32.7	13.6	33
56	1	6	5.27	13.7	41.9	79.5	26	32.7	13	25
57	1	5	5.03	12.8	40.4	80.3	25.4	31.7	13.6	29
61	1	4	4.76	13.2	40.2	84.5	27.7	32.8	12.7	21
62	1	3	5.16	13.8	43.8	84.9	26.7	31.5	13.5	31
63	1	5	4.71	12.6	38.8	92.4	26.8	32.5	12.9	24
64	1	2	5.45	13	40.2	73.8	23.9	32.3	13.9	18
65	1	4	5.75	15	45	78.3	26.1	33.3	13	34
67	1	3	5.3	14.2	42.5	80.2	26.6	33.4	13.1	25
68	1	4	4.86	13.3	39.8	81.9	27.4	33.4	13.8	29
69	1	3	4.77	12.9	40	83.9	27	32	12.9	13
70	1	5	5.56	13.7	42.1	75.7	24.6	32.5	14	37

Codigo	Grupo	Edad (Años)	RBC (10 ⁶ x ul)	HB (g/dL)	HTC (%)	MCV(fl)	MCH (pg)	MCHC (g/Dl)	RDW-CV (%)	Ferritina ng/mL
75	1	4	4.78	12.6	37.6	98.7	26.4	33.5	13.4	28
77	1	4	4.68	13.4	40.2	85.9	28.6	33.3	13.3	41
78	1	3	5.39	13.4	41.1	76.3	24.9	32.6	14.7	34
79	1	5	4.78	12.6	40.1	83.9	26.4	31.4	14	27
80	1	5	4.75	12.8	39.1	82.3	26.9	32.7	12.5	14
81	1	4	5.04	13.4	41.8	82.9	26.6	32.1	13.9	17
82	1	5	5.24	13.2	41.7	79.6	25.2	31.7	13.1	15
72	1	4	5.04	12	41.4	82.1	25.6	31.2	13.6	13
85	2	4	4.38	10.4	34.2	70.8	21.5	30.4	17.1	10
86	2	3	1.92	7.3	22.6	61	23	28	19.1	11
23	2	4	4.44	9.4	31.6	71.2	21.2	29.7	16.1	12
100	2	3	3.65	8.9	28.7	78.6	24.4	31	18	9
101	2	3	3.54	8.2	26.9	76	26	23.3	22.2	12
103	2	2	5.79	7.7	30	51.8	13.3	25.7	26.5	9
104	2	4	4.29	8.8	31.6	73.3	20.5	27.8	14.8	11
107	2	3	3.78	9.6	30.5	80.7	25.4	31.5	23.8	8
109	2	2	3.85	9.4	31.7	82.3	24.4	29.7	15.1	8
110	2	2	3.83	9.7	31	80.9	25	31	13.8	11
111	2	2	4.77	9.8	33.2	69.6	20.5	29.5	20.8	10
112	2	3	2.35	7.2	24	62	30	30	25	11
115	2	4	3.09	9.8	29.3	84	30.1	31.7	17.7	9
116	2	3	2.78	8.3	24.3	87.4	29.9	34.2	14.9	11
118	2	3	3.37	9.6	29.6	87.8	28.5	32.4	15	11
119	2	5	4.02	10	30.6	76.1	24.9	32.7	12.8	11
120	2	4	2.87	8.2	27.8	76	28.6	29.5	17	11
121	2	5	3.65	9.9	33.5	81	27.1	29.6	14.8	9
122	2	3	2.67	7.4	22.1	82.2	27.7	33.5	17.8	10
123	2	3	3.04	9	29.5	77	29.6	30.5	15.5	12
125	2	5	4.2	9.3	32.8	78.1	22.1	28.4	19.7	8
126	2	4	3.67	10	31.5	85.8	21.2	31.7	14.9	12
128	2	3	3.5	9.6	31.6	80	27.4	30.4	14.9	8

Codigo	Grupo	Ret (%)	Ret2 (10 ⁶ x ul)	IRF (%)	RET- HB(pg)	HRF (%)	MRF(%)	LRF(%)
2	1	0.7	0.0339	4.5	33.4	95.5	4.5	0
3	1	2.16	0.116	5	33.3	95	5	0
7	1	1.01	0.0487	4.1	32.2	95.9	3.6	0.5
9	1	0.74	0.038	0.7	28.3	99.3	0.7	0
10	1	1.08	0.055	9.1	34	90.9	8.6	0.5
11	1	0.68	0.0321	3.8	33	96.2	3.8	0
12	1	1.25	0.0613	2.5	35.6	97.5	2.1	0.4
17	1	2.52	0.1194	8.1	32.7	91.7	7.9	0.2
19	1	1.83	0.0933	7.3	33.5	92.7	7	0.3
20	1	0.53	0.0272	3.9	28.8	96.1	3.9	0
21	1	1.16	0.0617	3.2	33.4	96.8	3.2	0
24	1	1.11	0.0555	5.6	32	94.4	5.1	0.5
27	1	2.39	0.115	4.6	34	95.4	4.6	0
28	1	1.52	0.078	3.5	32.3	96.5	3.5	0
29	1	1.65	0.0809	3.6	33.5	96.4	3.5	0
32	1	1.67	0.0762	1.7	36.1	93.7	5.7	0.6
33	1	1.98	0.1016	3	34.4	97	2.7	0.3
35	1	1.04	0.0526	4.1	32.9	95.9	4.1	0
37	1	1.27	0.0718	12.1	31	87.9	10.4	1.7
39	1	1.71	0.0929	10.7	32.3	92.7	6.1	1.2
41	1	1.03	0.054	0.5	32.1	99.5	0	0.5
42	1	1.33	0.067	4.3	32.4	95.7	3.9	0.4
49	1	0.4	0.0197	0	27.7	100	0	0
52	1	2.17	0.1115	2.2	33.2	97.8	2.2	0
53	1	1.49	0.0751	4.7	33.3	95.3	4.3	0.4
55	1	1.06	0.0508	3.5	32.9	96.5	3	0.5
56	1	0.6	0.0316	4.4	32.2	95.6	4.4	0
57	1	1.11	0.0558	2.4	33.2	97.6	1.9	0.5
61	1	1.17	0.0557	4.6	35.4	95.4	4.1	0.5
62	1	1.32	0.0681	2.4	33.7	97.6	2.4	0
63	1	1.64	0.0772	2.3	34.4	97.7	2.3	0
64	1	0.7	0.0382	0.8	30.3	99.2	0.8	0
65	1	0.52	0.0299	1	31.9	99	1	0
67	1	1.31	0.0694	3.2	34.3	96.8	3.2	0
68	1	1.85	0.0899	5	35.2	95	4.2	0.8
69	1	2.11	0.1006	2.5	34.8	97.5	2.5	0
70	1	0.88	0.0489	3	32	97	3	0
75	1	0.89	0.0425	4.1	33.3	95.9	4.1	0
77	1	1.15	0.0538	5.1	36.9	94.2	4.2	0.9

Codigo	Grupo	Ret (%)	Ret2 (10 ⁶ x ul)	IRF (%)	RET- HB(pg)	HRF (%)	MRF (%)	LRF (%)
78	1	0.65	0.035	1.6	33.1	98.4	1.6	0
79	1	0.77	0.0368	4.1	33.9	95.9	3.4	0.7
80	1	1.03	0.0489	1.5	32.9	98.5	1.5	0
81	1	0.69	0.0348	6.3	32.4	93.7	5.5	0.8
82	1	1.84	0.0964	4	32.5	96	4	0
72	1	0.82	0.0413	9	31.6	91	7.7	1.3
85	2	0.8	0.0386	10.3	26.7	89.7	8.2	2.1
86	2	0.98	0.0476	15.2	28.2	84.8	10.7	4.5
23	2	0.69	0.0306	8.7	24	91.3	6.3	2.4
100	2	0.38	0.0139	19.8	10	80.2	14.5	5.3
101	2	0.6	0.0212	4.2	4.2	95.8	3.4	0.8
103	2	1.34	0.0776	18.3	14.1	81.7	15.5	2.8
104	2	1.03	0.0442	10	24	90	9	1
107	2	0.15	0.0057	14.3	15	85.7	14.3	0
109	2	0.7	0.027	9.4	18	90.6	8.5	1
110	2	2.04	0.0781	18.6	19	81.4	16.6	2
111	2	3.67	0.14	9.9	22	90.1	8.7	1.2
112	2	6.53	0.1435	11.7	13	88.3	9.8	1.9
115	2	5.79	0.1419	27.9	21.1	72.1	19.4	8.5
116	2	2.58	0.1407	14.1	20.9	85.9	13	1.1
118	2	6.64	0.1389	30.8	18.8	69.2	20	10.8
119	2	0.58	0.0233	6.2	20.2	93.8	5.3	0.9
120	2	1.77	0.0508	5	19	95	5	0
121	2	2.3	0.084	16.9	16.9	83.1	14.9	2
122	2	0.21	0.0056	10.5	17.9	89.5	10.5	0
123	2	2.36	0.0717	12.7	16.4	87.3	11.8	0.9
125	2	1.43	0.0601	16.6	14.6	83.4	14	2.6
126	2	1.27	0.0466	16.9	23.2	83.1	13.6	3.3
128	2	2.58	0.0903	22.7	23.7	77.3	17.6	5.1
129	2	2.26	0.0827	24.3	23.1	75.7	20.6	3.7
130	2	4.19	0.1462	15.6	21.5	84.4	13.8	1.8
131	2	3.19	0.1152	17.4	23.6	82.6	14.5	2.9
132	2	0.45	0.0089	27.1	17.7	72.9	20.3	6.8
133	2	1.02	0.038	7.4	22.8	92.6	4.9	2.5
134	2	1.65	0.0533	1.9	18.7	98.1	1.9	0
135	2	2.35	0.0797	25.8	16.4	74.2	20.8	5
136	2	1.52	0.0587	17.6	16.2	82.4	15	2.6
137	2	1.91	0.0628	22.8	14.5	77.2	19.5	3.3
138	2	2.68	0.0804	10.3	17.3	89.7	10.1	0.2

Codigo	Grupo	Ret (%)	Ret2 (10 ⁶ x ul)	IRF (%)	RET- HB(pg)	HRF (%)	MRF(%)	LRF(%)
147	2	1.54	0.0665	5.4	18.5	94.6	5	0.4
148	2	1.19	0.0392	4	23.1	96	4	0
149	2	2.06	0.0781	15.3	19.3	84.7	12.5	2.8
150	2	1.18	0.0412	10.5	15.9	89.5	9.6	0.9
151	2	1.34	0.0456	8.6	22.9	91.4	8.2	0.4
152	2	1.13	0.0394	2.3	21.5	97.4	2.3	0
153	2	3.21	0.112	11	23.5	89	10.1	0.9
155	2	4.99	0.1297	21.5	23.4	78.4	18	3.6
156	2	2.21	0.0732	36.3	23.4	63.7	18.4	17.9
105	2	1.06	0.0457	6.6	18.2	93.4	5.6	1
106	2	1.79	0.0782	12.5	18	87.5	10.7	1.8
108	2	0.64	0.0279	18.9	13	81.1	14.8	4.1

Anexo 3: Estadísticas Descriptiva de grupos

Descriptivos

			Controles		Casos	
			Estadístico	Error típ.	Estadístico	Error típ.
Edad (Años)	Media		3.7333	.16937	3.6889	.15183
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	3.3920		3.3829	
		Límite superior	4.0747		3.9949	
	Media recortada al 5%		3.7099		3.6605	
	Mediana		4.0000		4.0000	
	Varianza		1.291		1.037	
	Desv. típ.		1.13618		1.01852	
	Mínimo		2.00		2.00	
	Máximo		6.00		6.00	
	Rango		4.00		4.00	
	Amplitud intercuartil		2.00		1.00	
	Asimetría		.070	.354	.404	.354
	Curtosis		-.901	.695	-.374	.695
	RBC x1,000,000/uL	Media		5.0520	.04118	3.5756
Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior	4.9690		3.3603	
		Límite superior	5.1350		3.7909	
Media recortada al 5%			5.0403		3.5741	
Mediana			5.0400		3.5400	
Varianza			.076		.514	
Desv. típ.			.27622		.71664	
Mínimo			4.56		1.92	
Máximo			5.75		5.79	
Rango			1.19		3.87	
Amplitud intercuartil			.44		.68	
Asimetría			.533	.354	.173	.354
Curtosis			-.189	.695	1.508	.695
HB g/dL		Media		13.1867	.08981	9.2867
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	13.0057		8.9691	
		Límite superior	13.3677		9.6042	
	Media recortada al 5%		13.1617		9.3667	
	Mediana		13.1000		9.6000	
	Varianza		.363		1.117	
	Desv. típ.		.60249		1.05693	
	Mínimo		12.00		5.50	
	Máximo		15.00		10.90	
	Rango		3.00		5.40	
	Amplitud intercuartil		1.10		1.05	
	Asimetría		.648	.354	-1.486	.354
	Curtosis		.376	.695	2.681	.695

Descriptivos

			Controles		Casos	
			Estadístico	Error típ.	Estadístico	Error típ.
HCT %	Media		40.5444	.26586	29.9956	.51367
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	40.0086		28.9603	
		Límite superior	41.0803		31.0308	
	Media recortada al 5%		40.4617		30.3216	
	Mediana		40.2000		31.1000	
	Varianza		3.181		11.874	
	Desv. típ.		1.78345		3.44581	
	Mínimo		37.60		18.00	
	Máximo		45.00		34.20	
	Rango		7.40		16.20	
	Amplitud intercuartil		2.90		3.25	
	Asimetría		.579	.354	-1.635	.354
	Curtosis		-.110	.695	2.715	.695
	MCV (fL)	Media		81.2422	.68628	78.8067
Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior	79.8591		76.3780	
		Límite superior	82.6253		81.2353	
Media recortada al 5%			80.8302		79.2130	
Mediana			80.2000		80.0000	
Varianza			21.194		65.348	
Desv. típ.			4.60368		8.08381	
Mínimo			73.80		51.80	
Máximo			98.70		97.70	
Rango			24.90		45.90	
Amplitud intercuartil			5.00		8.45	
Asimetría			1.720	.354	-.900	.354
Curtosis			4.414	.695	2.384	.695
MCH (pg)		Media		26.1711	.14105	26.1111
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	25.8868		25.0454	
		Límite superior	26.4554		27.1768	
	Media recortada al 5%		26.1599		26.3457	
	Mediana		26.2000		27.0000	
	Varianza		.895		12.582	
	Desv. típ.		.94619		3.54716	
	Mínimo		23.90		13.30	
	Máximo		28.60		30.80	
	Rango		4.70		17.50	
	Amplitud intercuartil		1.20		4.45	
	Asimetría		.116	.354	-1.169	.354
	Curtosis		.249	.695	2.354	.695

Descriptivos

			Controles		Casos	
			Estadístico	Error típ.	Estadístico	Error típ.
MCHC (g/dL)	Media		32.5667	.09299	30.5378	.34539
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	32.3793		29.8417	
		Límite superior	32.7541		31.2339	
	Media recortada al 5%		32.5796		30.7457	
	Mediana		32.6000		31.0000	
	Varianza		.389		5.368	
	Desv. típ.		.62377		2.31696	
	Mínimo		31.20		22.70	
	Máximo		33.80		34.20	
	Rango		2.60		11.50	
	Amplitud intercuartil		.65		2.05	
	Asimetría		-.280	.354	-1.606	.354
	Curtosis		-.223	.695	3.775	.695
	RDW-CV (%)	Media		13.4156	.07759	16.4556
Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior	13.2592		15.4729	
		Límite superior	13.5719		17.4382	
Media recortada al 5%			13.4111		16.1846	
Mediana			13.5000		15.5000	
Varianza			.271		10.699	
Desv. típ.			.52047		3.27092	
Mínimo			12.30		12.00	
Máximo			14.70		26.50	
Rango			2.40		14.50	
Amplitud intercuartil			.80		3.70	
Asimetría			.104	.354	1.346	.354
Curtosis			-.309	.695	1.728	.695
Ferritina (ng/mL)		Media		25.0822	1.14128	10.2222
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	22.7821		9.7790	
		Límite superior	27.3823		10.6655	
	Media recortada al 5%		24.8938		10.2716	
	Mediana		25.0000		11.0000	
	Varianza		58.613		2.177	
	Desv. típ.		7.65593		1.47539	
	Mínimo		13.00		7.00	
	Máximo		41.00		12.00	
	Rango		28.00		5.00	
	Amplitud intercuartil		12.00		2.50	
	Asimetría		.111	.354	-.358	.354
	Curtosis		-.688	.695	-1.080	.695

Descriptivos

			Controles		Casos	
			Estadístico	Error típ.	Estadístico	Error típ.
Reticulocitos (%)	Media		1.2562	.08046	1.9996	.23360
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	1.0941		1.5288	
		Límite superior	1.4184		2.4704	
	Media recortada al 5%		1.2352		1.8496	
	Mediana		1.1500		1.5400	
	Varianza		.291		2.456	
	Desv. típ.		.53972		1.56705	
	Mínimo		.40		.15	
	Máximo		2.52		6.64	
	Rango		2.12		6.49	
	Amplitud intercuartil		.87		1.47	
	Asimetría		.567	.354	1.560	.354
	Curtosis		-.484	.695	2.256	.695
	Reticulocitos (x 1,000,000/uL)	Media		.063200	.0039898	.067211
Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior	.055159		.054995	
		Límite superior	.071241		.079427	
Media recortada al 5%			.062357		.066316	
Mediana			.055700		.060100	
Varianza			.001		.002	
Desv. típ.			.0267645		.0406613	
Mínimo			.0197		.0056	
Máximo			.1194		.1462	
Rango			.0997		.1406	
Amplitud intercuartil			.0397		.0445	
Asimetría			.531	.354	.580	.354
Curtosis			-.657	.695	-.545	.695
IRF (%)		Media		4.079	.3875	14.529
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	3.298		12.170	
		Límite superior	4.860		16.888	
	Media recortada al 5%		3.897		14.186	
	Mediana		3.900		14.100	
	Varianza		6.757		61.647	
	Desv. típ.		2.5994		7.8515	
	Mínimo		0.0		1.9	
	Máximo		12.1		36.3	
	Rango		12.1		34.4	
	Amplitud intercuartil		2.5		9.7	
	Asimetría		1.179	.354	.638	.354
	Curtosis		1.709	.695	.168	.695

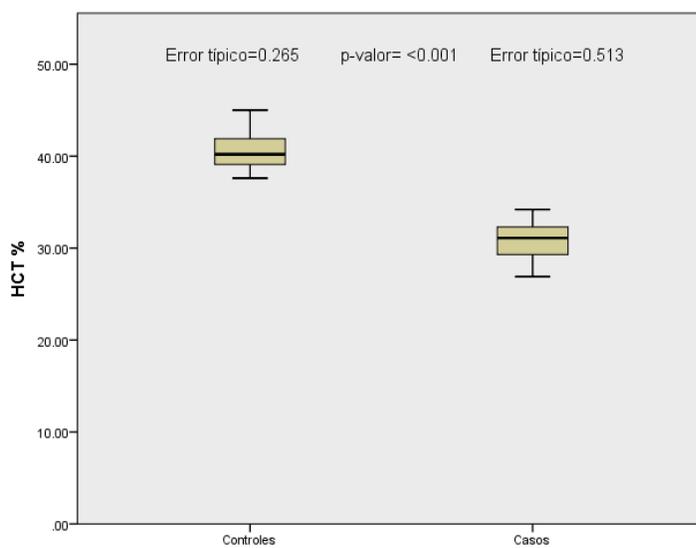
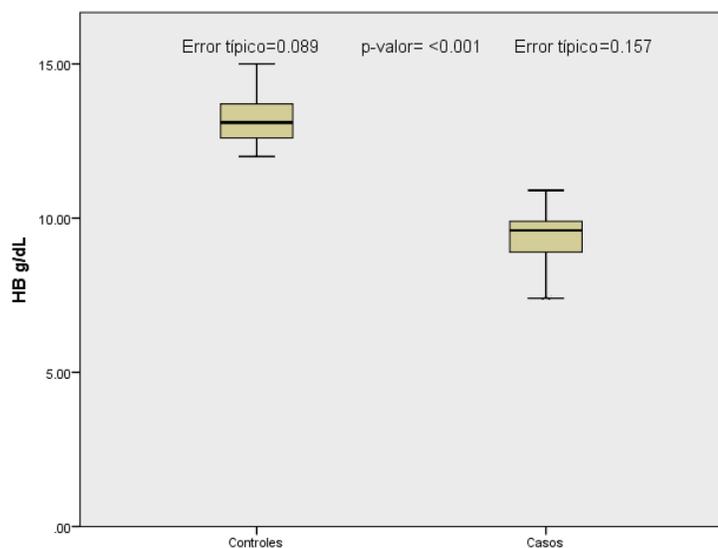
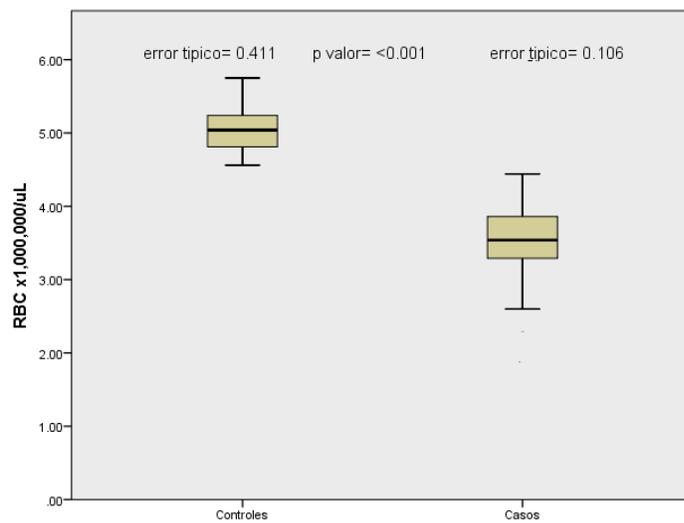
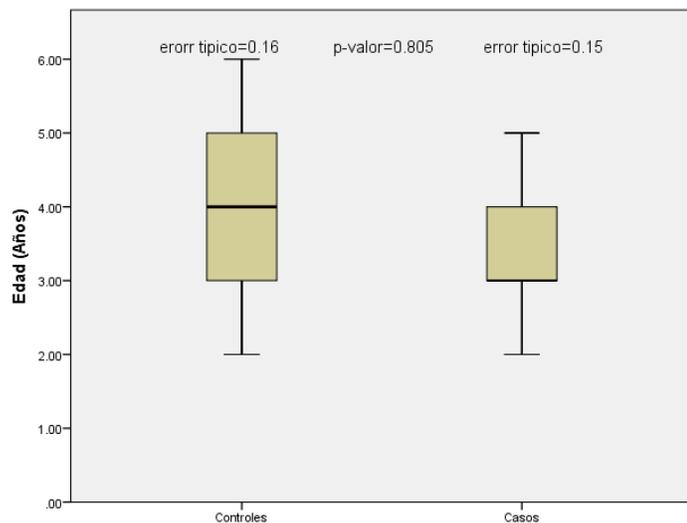
Descriptivos

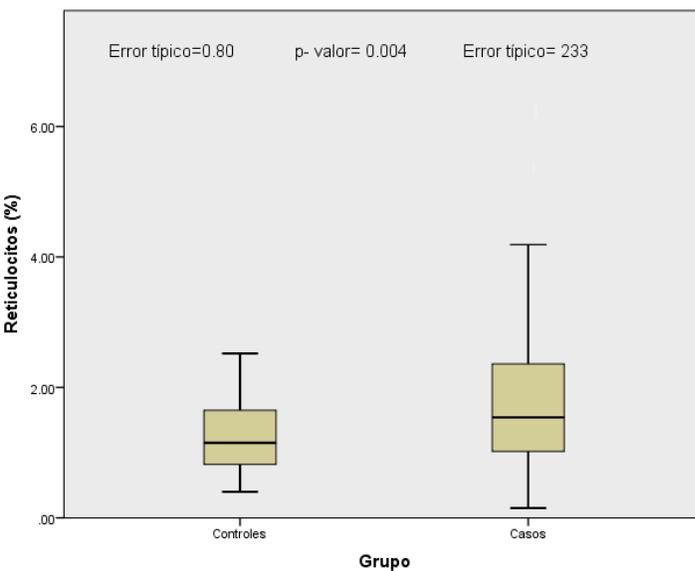
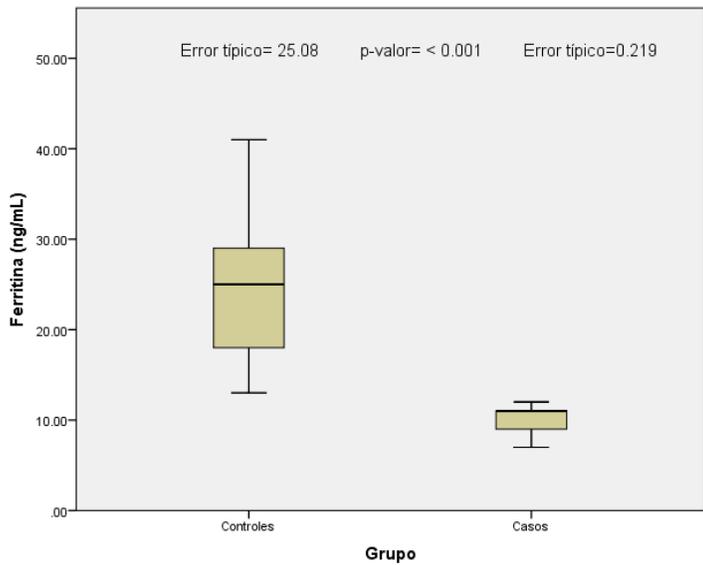
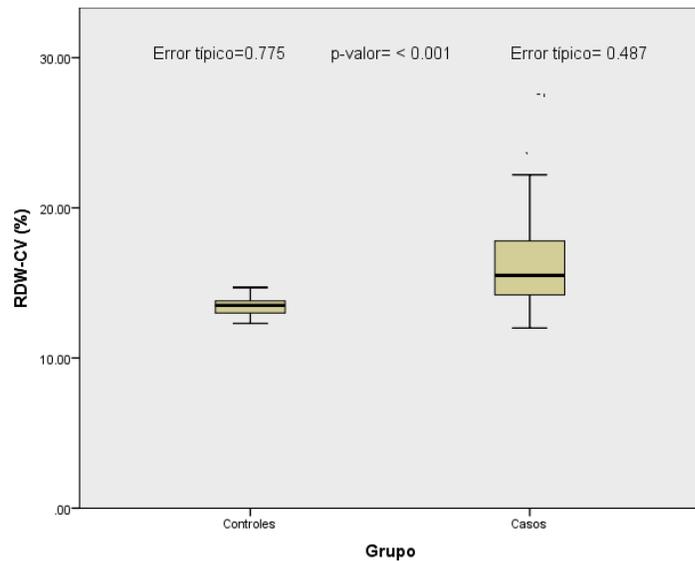
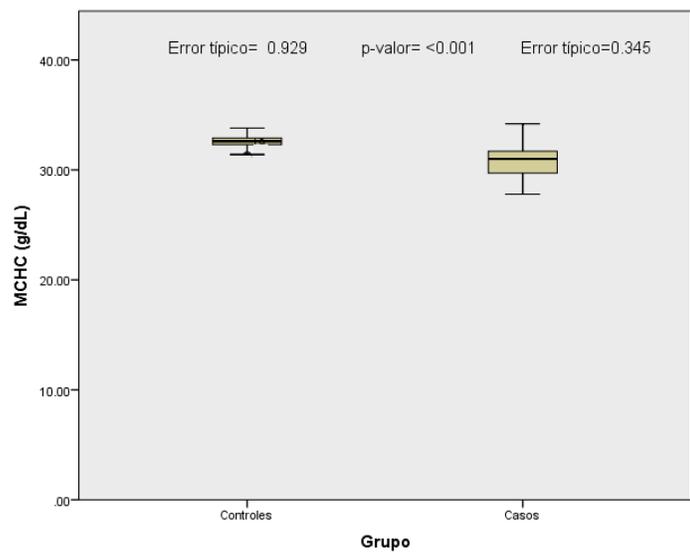
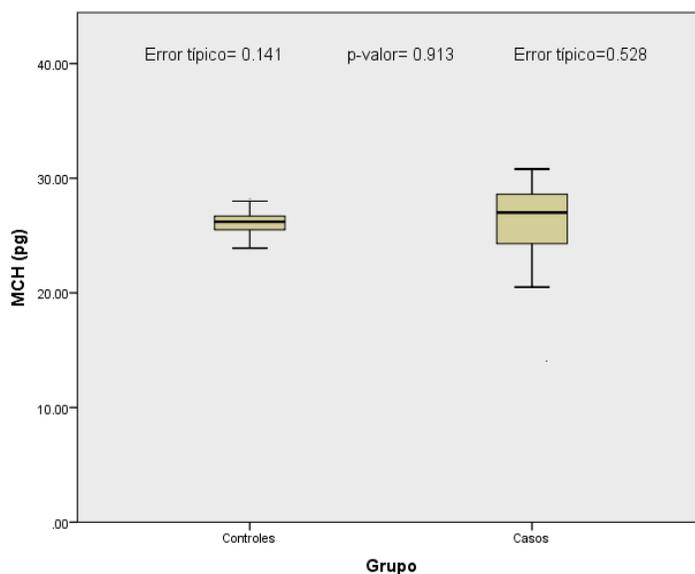
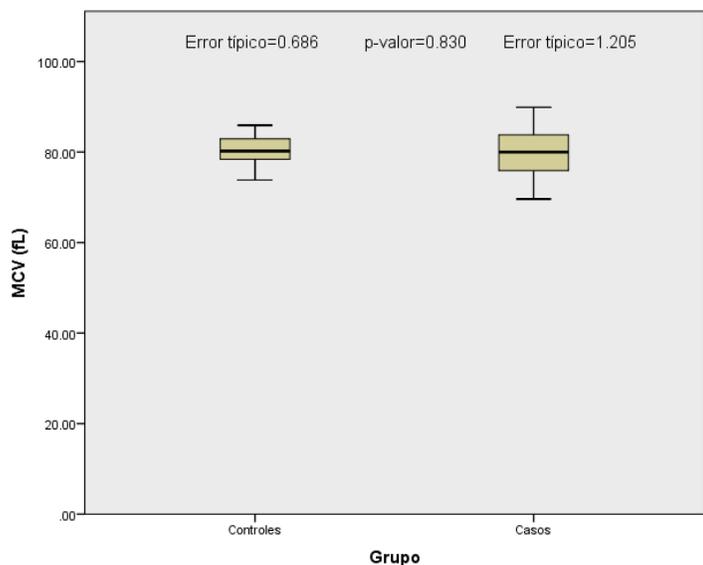
		Controles		Casos		
		Estadístico	Error típ.	Estadístico	Error típ.	
RETHb(pg)	Media	32.9400	.26948	19.1867	.67510	
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	32.3969		17.8261	
		Límite superior	33.4831		20.5472	
	Media recortada al 5%	33.0173		19.3840		
	Mediana	33.1000		19.0000		
	Varianza	3.268		20.509		
	Desv. típ.	1.80774		4.52868		
	Mínimo	27.70		4.20		
	Máximo	36.90		28.20		
	Rango	9.20		24.00		
	Amplitud intercuartil	1.75		6.70		
	Asimetría	-.763	.354	-.774	.354	
	Curtosis	1.830	.695	1.530	.695	
	LFR (%)	Media	95.873	.3668	85.462	1.1692
Intervalo de confianza para la media al 95%		Límite inferior	95.134		83.106	
		Límite superior	96.613		87.819	
Media recortada al 5%		96.010		85.812		
Mediana		96.000		85.900		
Varianza		6.055		61.514		
Desv. típ.		2.4607		7.8431		
Mínimo		87.9		63.7		
Máximo		100.0		98.1		
Rango		12.1		34.4		
Amplitud intercuartil		2.6		9.7		
Asimetría		-.982	.354	-.644	.354	
Curtosis		1.581	.695	.166	.695	
MFR (%)		Media	3.804	.3258	11.804	.8024
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	3.148		10.187	
		Límite superior	4.461		13.422	
	Media recortada al 5%	3.705		11.844		
	Mediana	3.800		11.800		
	Varianza	4.777		28.971		
	Desv. típ.	2.1856		5.3825		
	Mínimo	0.0		1.9		
	Máximo	10.4		20.8		
	Rango	10.4		18.9		
	Amplitud intercuartil	2.2		7.1		
	Asimetría	.791	.354	-.036	.354	
	Curtosis	1.170	.695	-.960	.695	

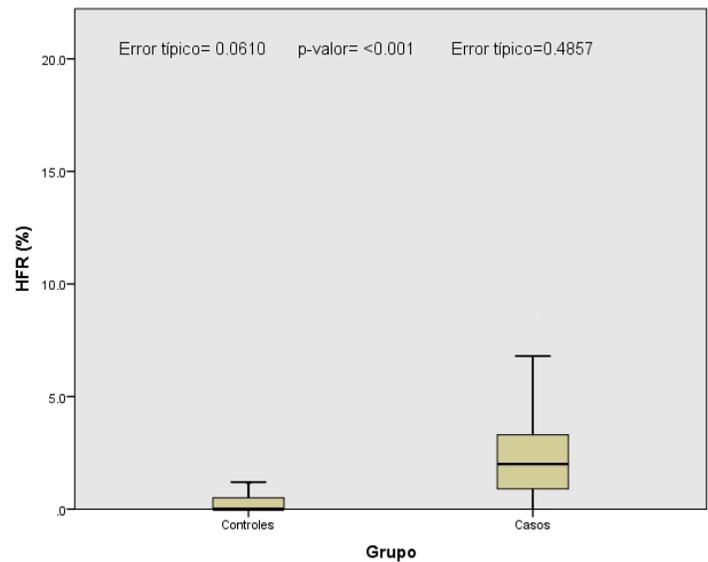
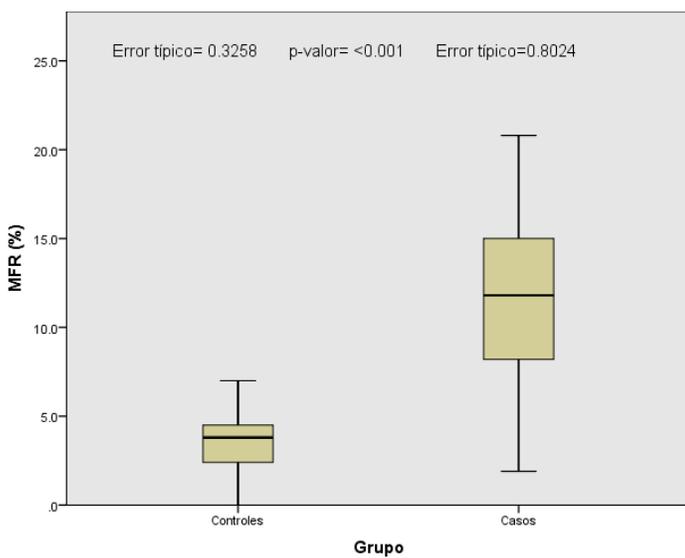
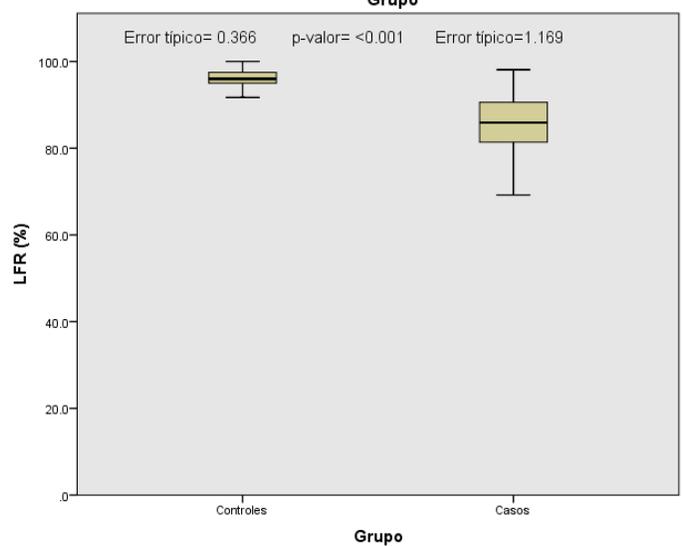
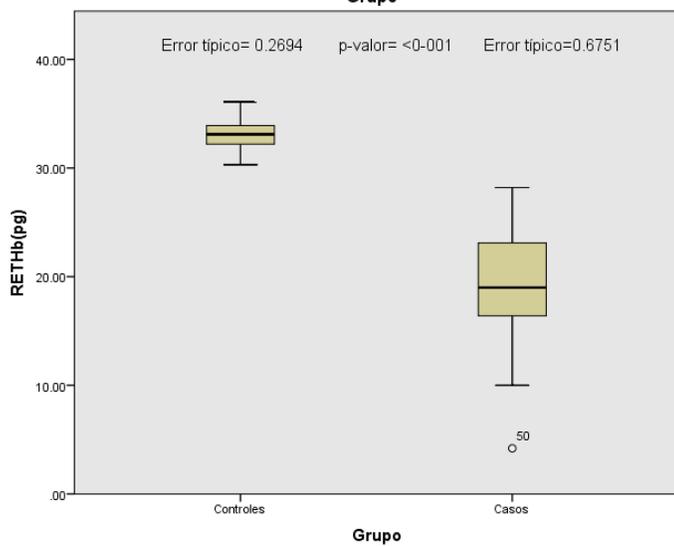
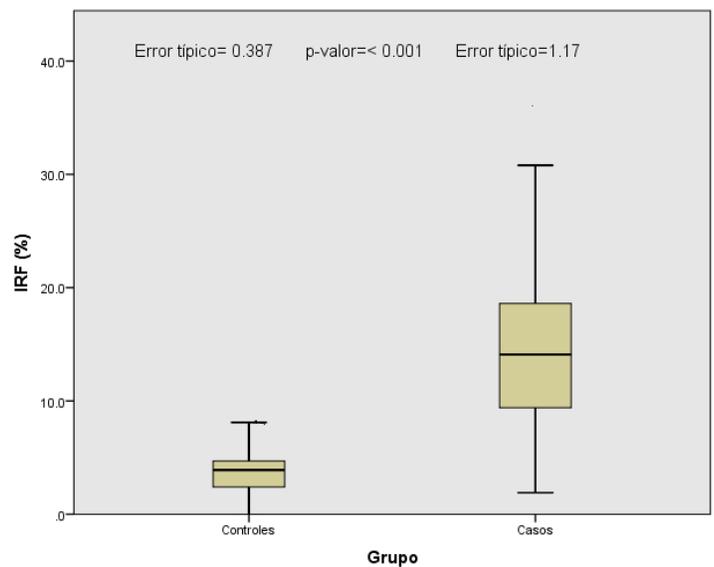
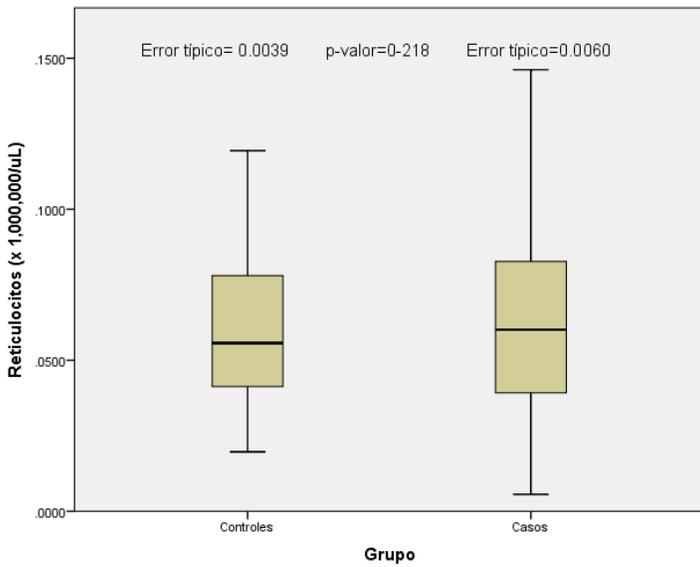
Descriptivos

		Controles		Casos	
		Estadístico	Error típ.	Estadístico	Error típ.
HFR (%)	Media	.300	.0610	2.729	.4857
	Intervalo de confianza para la media al 95%				
	Límite inferior	.177		1.750	
	Límite superior	.423		3.708	
	Media recortada al 5%	.252		2.271	
	Mediana	0.000		2.000	
	Varianza	.167		10.614	
	Desv. típ.	.4090		3.2580	
	Mínimo	0.0		0.0	
	Máximo	1.7		17.9	
	Rango	1.7		17.9	
	Amplitud intercuartil	.5		2.6	
	Asimetría	1.544	.354	2.825	.354
	Curtosis	2.363	.695	10.484	.695

Anexo 4: Gráficos de diferencias de medias de pruebas convencionales para el diagnóstico de deficiencia de hierro e índices reticulocitarios.







Anexo 5: Resumen de la Prueba de Kolgomorov- Smirnov, generada en el software SPSS 20.0

Resumen de prueba de hipótesis			Casos	Controles		
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión	Sig.	Decisión
1	La distribución de Edad (Años) es normal con la media 3.69 y la desviación típica 1.02.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.011	Rechazar la hipótesis nula.	.092	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de RBC x1,000,000 /uL es normal con la media 3.58 y la desviación típica 0.72.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.745	Retener la hipótesis nula.	.861	Retener la hipótesis nula.
3	La distribución de HB g/dL es normal con la media 9.29 y la desviación típica 1.06.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.067	Retener la hipótesis nula.	.641	Retener la hipótesis nula.
4	La distribución de HCT % es normal con la media 30.00 y la desviación típica 3.45.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.125	Retener la hipótesis nula.	.410	Retener la hipótesis nula.
5	La distribución de MCV (fL) es normal con la media 78.81 y la desviación típica 8.08.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.549	Retener la hipótesis nula.	.356	Retener la hipótesis nula.
6	La distribución de MCH (pg) es normal con la media 26.11 y la desviación típica 3.55.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.644	Retener la hipótesis nula.	.990	Retener la hipótesis nula.
7	La distribución de MCHC (g/dL) es normal con la media 30.54 y la desviación típica 2.32.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.141	Retener la hipótesis nula.	.622	Retener la hipótesis nula.
8	La distribución de RDW-CV (%) es normal con la media 16.46 y la desviación típica 3.27.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.266	Retener la hipótesis nula.	.913	Retener la hipótesis nula.
9	La distribución de Ferritina (ng/mL) es normal con la media 10.22 y la desviación típica 1.48.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.035	Rechazar la hipótesis nula.	.866	Retener la hipótesis nula.
10	La distribución de Reticulocitos (%) es normal con la media 2.00 y la desviación típica 1.57.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.175	Retener la hipótesis nula.	.547	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

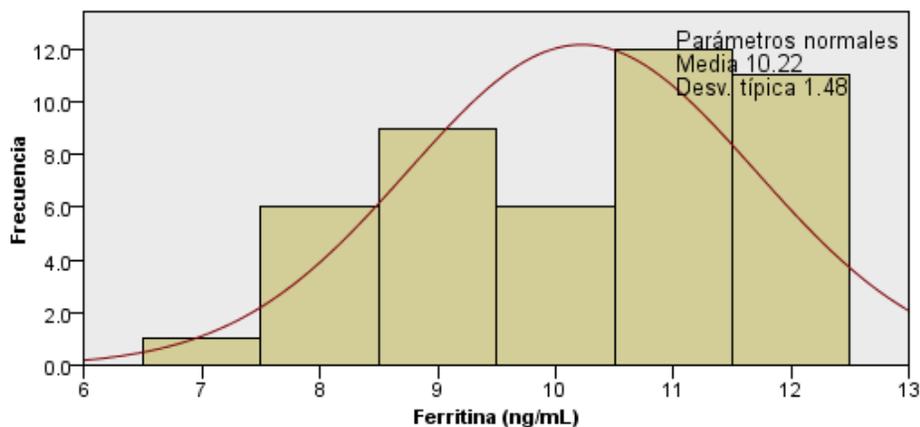
Resumen de prueba de hipótesis		Casos		Controles		
	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión	Sig.	Decisión
11	La distribución de Reticulocitos (1,000,000/uL) es normal con la media 0.07 y la desviación típica 0.04.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.562	Retener la hipótesis nula.	.322	Retener la hipótesis nula.
12	La distribución de IRF (%) es normal con la media 14.53 y la desviación típica 7.85.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.801	Retener la hipótesis nula.	.151	Retener la hipótesis nula.
13	La distribución de RETHb(pg) es normal con la media 19.19 y la desviación típica 4.53.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.765	Retener la hipótesis nula.	.269	Retener la hipótesis nula.
14	La distribución de LFR (%) es normal con la media 85.46 y la desviación típica 7.84.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.794	Retener la hipótesis nula.	.331	Retener la hipótesis nula.
15	La distribución de MFR (%) es normal con la media 11.80 y la desviación típica 5.38.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.960	Retener la hipótesis nula.	.379	Retener la hipótesis nula.
16	La distribución de HFR (%) es normal con la media 2.73 y la desviación típica 3.26.	Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra	.052	Retener la hipótesis nula.	.001	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.

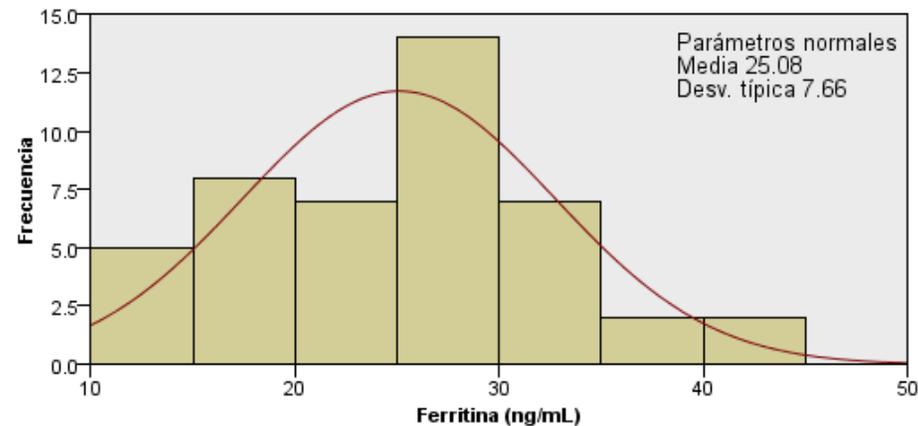
Anexo 6: Forma Gráfica de la distribución de algunos datos generados por la prueba de Kolgomorov-Smirnoff como criterio para escoger la prueba a utilizar para diferenciar medias

Los siguientes gráficos muestran el comportamiento de la distribución de los datos de la Ferritina, puede observarse que ambas muestras, (casos y controles de izquierda a derecha respectivamente) se manifiestan diferentes distribuciones, anormal y normal, por este comportamiento se procede a aplicar la prueba U de Mann Witney para muestras independientes.

Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra



Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra

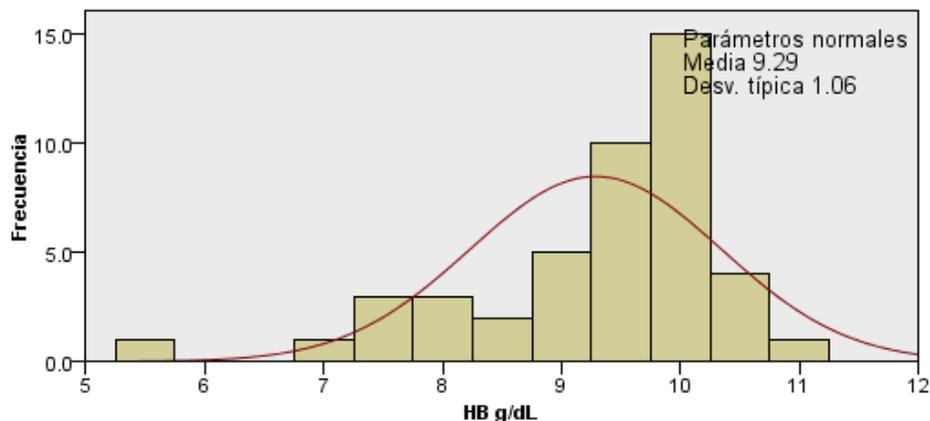


N total		45
	Absolutos	.212
Diferencias más extremas	Positivos	.152
	Negativos	-.212
Probar estadística		1.423
Sig. asintótica (prueba de dos caras)		.035

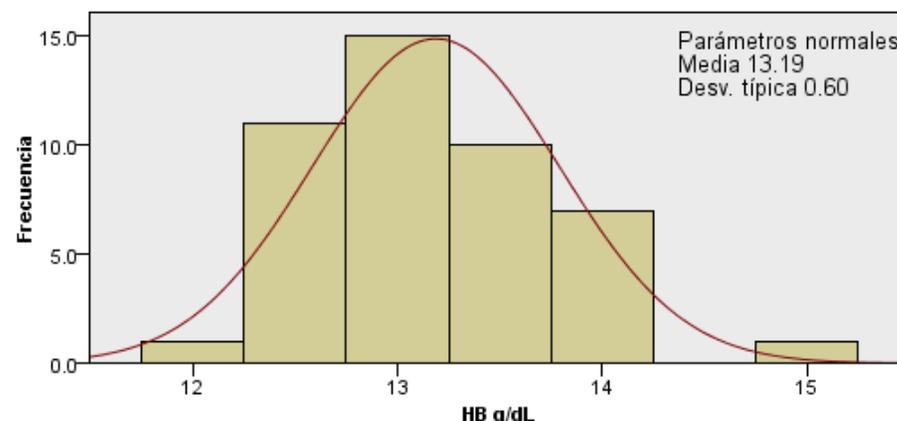
N total		45
	Absolutos	.089
Diferencias más extremas	Positivos	.089
	Negativos	-.088
Probar estadística		.598
Sig. asintótica (prueba de dos caras)		.866

Los siguientes gráficos muestran el comportamiento de la distribución de los datos de la Hemoglobina, puede observarse que ambas muestras, (casos y controles de izquierda a derecha respectivamente) muestra una distribución normal. Cuando se presenta este comportamiento de distribución normal en ambas muestras se escoge la prueba t- student para muestras independientes.

Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra



Prueba Kolmogorov-Smirnov de una muestra



N total		45
	Absolutos	.194
Diferencias más extremas	Positivos	.139
	Negativos	-.194
Probar estadística		1.304
Sig. asintótica (prueba de dos caras)		.067

N total		45
	Absolutos	.111
Diferencias más extremas	Positivos	.111
	Negativos	-.105
Probar estadística		.742
Sig. asintótica (prueba de dos caras)		.641

Anexo 7: Resultados de la Prueba t-student para muestras independientes ejecutada en el software SPSS 20.0

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
RBC x1,000,000/uL	Se han asumido varianzas iguales	15.090	.000	12.896	88	.000	1.47644	.11449	1.24892	1.70397
	No se han asumido varianzas iguales			12.896	56.791				.000	1.47644
HB g/dL	Se han asumido varianzas iguales	7.070	.009	21.504	88	.000	3.90000	.18136	3.53959	4.26041
	No se han asumido varianzas iguales			21.504	69.865				.000	3.90000
HCT %	Se han asumido varianzas iguales	7.883	.006	18.238	88	.000	10.54889	.57839	9.39945	11.69833
	No se han asumido varianzas iguales			18.238	65.995				.000	10.54889
MCV (fL)	Se han asumido varianzas iguales	7.914	.006	1.756	88	.083	2.43556	1.38678	-3.2037	5.19148
	No se han asumido varianzas iguales			1.756	69.824				.083	2.43556
MCH (pg)	Se han asumido varianzas iguales	38.202	.000	.110	88	.913	.06000	.54727	-1.02758	1.14758
	No se han asumido varianzas iguales			.110	50.230				.913	.06000
MCHC (g/dL)	Se han asumido varianzas iguales	17.770	.000	5.672	88	.000	2.02889	.35769	1.31805	2.73972
	No se han asumido varianzas iguales			5.672	50.345				.000	2.02889
RDW-CV (%)	Se han asumido varianzas iguales	40.455	.000	-6.157	88	.000	-3.04000	.49373	-4.02119	-2.05881
	No se han asumido varianzas iguales			-6.157	46.227				.000	-3.04000

Prueba de muestras independientes

		Prueba de Levene para la igualdad de varianzas		Prueba T para la igualdad de medias						
		F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Error típ. de la diferencia	95% Intervalo de confianza para la diferencia	
									Inferior	Superior
Reticulocitos (%)	Se han asumido varianzas iguales	18.045	.000	-3.009	88	.003	-.74333	.24707	-1.23433	-.25233
	No se han asumido varianzas iguales			-3.009	54.294	.004	-.74333	.24707	-1.23862	-.24805
Reticulocitos (x 1,000,000/uL)	Se han asumido varianzas iguales	6.597	.012	-.553	88	.582	-.0040111	.0072567	-.0184323	.0104100
	No se han asumido varianzas iguales			-.553	76.101	.582	-.0040111	.0072567	-.0184637	.0104415
RETHb(pg)	Se han asumido varianzas iguales	24.213	.000	18.921	88	.000	13.75333	.72689	12.30879	15.19788
	No se han asumido varianzas iguales			18.921	57.675	.000	13.75333	.72689	12.29812	15.20854
IRF (%)	Se han asumido varianzas iguales	36.014	.000	-8.476	88	.000	-10.4496	1.2329	-12.8997	-7.9994
	No se han asumido varianzas iguales			-8.476	53.531	.000	-10.4496	1.2329	-12.9219	-7.9772
LFR (%)	Se han asumido varianzas iguales	37.725	.000	8.496	88	.000	10.4111	1.2254	7.9759	12.8463
	No se han asumido varianzas iguales			8.496	52.579	.000	10.4111	1.2254	7.9529	12.8694
MFR (%)	Se han asumido varianzas iguales	38.272	.000	-9.238	88	.000	-8.0000	.8660	-9.7210	-6.2790
	No se han asumido varianzas iguales			-9.238	58.126	.000	-8.0000	.8660	-9.7334	-6.2666

Anexo 8: Resultados de la U de Mann Whitney para muestras independientes ejecutada en el software SPSS 20.0

Resumen de prueba de hipótesis

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	La distribución de Edad (Años) es la misma entre las categorías de Grupo.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	.805	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de Ferritina (ng/mL) es la misma entre las categorías de Grupo.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	.000	Rechazar la hipótesis nula.
3	La distribución de HFR (%) es la misma entre las categorías de Grupo.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	.000	Rechazar la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es .05.