

REGULACION DEL HIERRO SOBRE LA EXPRESION DE RECEPTORES DE MEMBRANA DE LINFOCITOS T DE NIÑOS ANÉMICOS ESCOLARES

*Lourdes Zalles Cueto

**Karem Contreras Gutierrez

**Patricia Velásquez C

RESUMEN

La anemia producida por la carencia de hierro, es una de las afecciones de mayor prevalencia y constituye la mitad de todas las anemias a nivel mundial, esta deficiencia además de afectar parámetros bioquímicos y hematológicos es la principal causa de deterioro del sistema inmune y de la alteración en la expresión de receptores de membrana que son imprescindibles para el ingreso de micronutrientes a la célula.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar el efecto inmunomodulador del hierro sobre la inmunidad celular y la expresión de receptores de membrana celular de linfocitos T de niños escolares anémicos. El estudio se realizó en una población de 1095 escolares, se seleccionaron 67 niñas y 69 niños con edades comprendidas entre 5 y 10 años; de esta muestra el 74% presentó una concentración de hemoglobina $\leq 12,7$ g/L como punto de corte. A este grupo de niños se suministró sulfato ferroso por tres meses y se realizaron pruebas inmunológicas específicas empleando los marcadores de membrana CD1a y CD71. Los resultados muestran una prevalencia de anemia del 20% y reducción en un 51% en la concentración de receptores CD1a y CD71, existiendo una significativa correlación entre la disminución de linfocitos inmaduros y la desaparición de los receptores de transferrina sobre la superficie celular de los mismos.

Palabras Claves: Anemia. Hierro. Inmunomodulación. Linfocitos T. Receptores de membrana, escolares.

ABSTRACT

The anemia produced bay lack of iron, is one of the most prevalent affections and constitutes the half of all aenemias in the world. This deficiency besides of affect biochemical and haematologyc factors, it is the main cause of immune system deterioration and of alteration of membrane receptor expression, indispensable for micronutrientes entry to the cell.

The objective of the present work was to study the immunemodulator effect of iron upon de cell immunity and the expresión of T lymphocyte's membrane receptor of scholar children with anemia.

The study was carried out on a population of 1095 scholars, 67 girls and 69 boys were selected aged between 5 and 10 years old; From this sample, 74% presented a hemoglobin concentration of ≤ 12.7 g/l as cutting point. To this group of children it was suplied ferrous sulfate for three months and specific immunologic tests wre done using the membrane markers CD1a and CD71. The results show an anemia's prevalencia of 20% and reduction of receptor concentration on CD1a and CD71 51%. A significant correlation exist between the decrease of immature lymphocytes and the disappearance of the transferrina receptors from cellular surface of them.

Key words: Anemi, iron, inmunomodulation, Lynphocytes T, Membrane receptors, school children.

*Bioquímica - Farmaceutica, Laboratorio de Inmunología-SEDILAB Facultad de Medicina UMSS

**Biquímica-Farmacéutica SEDILAB

INTRODUCCION

En la actualidad, está plenamente comprobada la relación directa que existe entre nutrición e inmunidad, numerosos estudios científicos demuestran que la resistencia a diversas enfermedades disminuye cuando la nutrición es deficiente.

De todos los oligoelementos conocidos, el déficit de hierro es el problema más común de carencia de un único nutriente tanto en países desarrollados como en los países en desarrollo. Los alimentos en conjunto y sus componentes en particular, ejercen un papel importante en el desarrollo y preservación del sistema inmune; las deficiencias marginales, los excesos crónicos ó el desequilibrio entre nutrientes pueden dañarlo, por lo tanto el buen funcionamiento del sistema inmunitario, dependerá de un estado nutricional óptimo que mantenga el sistema.

La deficiencia de hierro es la deficiencia nutricional de mayor prevalencia a escala mundial y la principal causa de anemia ⁽¹⁾. En los países en vías de desarrollo los grupos mas afectados son los niños debido a los mayores requerimientos determinados por el crecimiento ^(2,3,4); este aumento de las necesidades no es cubierto por la dieta habitual, la que tiene cantidades insuficientes de hierro y/o presenta una baja biodisponibilidad de este nutriente debido a la presencia de inhibidores de su absorción y con un bajo contenido de hierro hemínico ⁽⁵⁾, en estas condiciones, el aporte de hierro es insuficiente para cubrir los requerimientos y se producen etapas progresivas de severidad de la deficiencia de hierro ⁽⁶⁾⁽⁷⁾.

En un primer momento de la enfermedad se agotan los depósitos y existe una deficiencia latente que se caracteriza por una disminución de la ferritina sérica. Si el aporte insuficiente continúa se compromete el aporte de hierro tisular etapa denominada eritropoyesis deficiente en hierro que se caracteriza precozmente, por un aumento de los receptores de transferrina séricos y expresión de los mismos a nivel de la membrana de células inmaduras, y más tarde, por una disminución de la saturación de la transferrina y aumento de la protoporfirina libre eritrocitaria. Finalmente al persistir el balance negativo se llega a la etapa más severa, caracterizada por una anemia microcítica hipocroma.

El hierro es un elemento esencial que participa en numerosos procesos biológicos, su vital importancia radica en que interviene en el metabolismo de diferentes células de defensa, su carencia da lugar a una menor proliferación linfocitaria y a una disminución en la capacidad bactericida del organismo. En los niños que sufren anemia por deficien-

cia de hierro, se asocia a disminución de la actividad fagocítica y alteración de los niveles de inmunoglobulinas y de la respuesta de las células T y producción de interleucinas ⁽⁸⁾. La biodisponibilidad del hierro celular puede incluso tener distinta influencia en la proliferación de células T (Th1 y Th2) modulando la actividad de diferentes subpoblaciones linfocitarias que pueden ser detectadas antes de la caída de las concentraciones de hemoglobina ⁽⁹⁾.

Los marcadores de superficie que permiten el reconocimiento de células inmaduras linfocitarias corresponden a los antígenos CD1a y se hallan presentes en aproximadamente 84% de los timocitos corticales. Las moléculas CD71 se expresan también en estas células, su síntesis es regulada en general por el estado de hierro y el crecimiento celular. Las células una vez activadas y en proliferación, responden a la demanda de hierro intracelular gracias a un mecanismo de regulación de la expresión de los receptores de transferrina a nivel de la membrana celular donde la homeostasis intracelular está asegurada por la regulación de la proteína reguladora del hierro (IRP1) la cual es mediada por los genes codificados por el receptor de la transferrina y por la ferritina, enteramente ligados a la concentración de hierro. Cuando la concentración de hierro es baja se fija sobre el elemento responsable del hierro bloqueando la síntesis de ferritina, a ello continúa un aumento de la densidad de receptores de transferrina en la superficie de las células inmaduras ^(10,11,12).

Así por ejemplo, en aquellos tejidos metabólicamente activos, donde aumentan los requerimientos intracelulares de hierro existirá un mayor número de receptores de transferrina en la superficie celular, valor que aumentará ya sea a través de la síntesis de nuevos receptores o por aumento en la velocidad de translocación de dicho receptor, de esta manera, aproximadamente 1/3 de la masa total de los receptores de transferrina están presentes en la superficie de la célula ^(13,14).

El objetivo de nuestro trabajo fue estudiar el efecto modulador del hierro sobre la expresión de antígenos de superficie CD1a y receptores de transferrina CD71 en la membrana celular de linfocitos T de niños escolares anémicos, para establecer el grado de compromiso de las capacidades inmunológicas por efecto de esta deficiencia nutricional.

MATERIALES Y METODOS

Este estudio se efectuó en escuelas elegidas al azar y de idénticas condiciones socioeconómicas ubicadas en la zona Sud (escuelas Ángel Honorato

Salazar y República del Perú) y en la zona de Sacaba (escuelas Copacabana, Incarancho, Guadalupe y Quintanilla) del departamento de Cochabamba.

Se estudió una población de 1095 niños escolares, de los cuales fueron seleccionados 136, los mismos que cumplieron estrictamente los criterios de selección. El grupo de estudio fue conformado por escolares de ambos sexos (67 niñas y 69 niños) cuyas edades estaban comprendidas entre 5 y 10 años que asistían a clases regularmente, sin ningún tratamiento médico a los cuales se tomaron muestras de sangre periférica obtenidas por punción venosa, previa autorización de sus padres.

Se utilizaron los siguientes criterios de selección: hemoglobina inferior o igual a 12,7 g/dL como punto de corte a 2500 metros de altura, hematocrito inferior o igual a 33%, hierro sérico inferior o igual a 39 ug/dL, ferritina inferior a 12 ng/dL.

Quienes recibieron tratamiento con sulfato ferroso a una dosis de 2-3 mg/Kg/día durante 3 meses. El grupo control estuvo constituido por 35 niños eutróficos.

La determinación de parámetros antropométricos y la valoración clínico nutricional se realizó utilizando datos de talla, peso y edad al inicio y al final del estudio. Los indicadores antropométricos para la valoración del estado nutricional de los niños se efectuó con los índices: Peso para la Talla (P/T), Peso para la Edad (P/E) y Talla para la Edad (T/E) según normas del Nacional Center Health Statistic (NCHS) utilizadas por el Ministerio de Salud y Deportes para la población de referencia boliviana. Se determinaron las siguientes pruebas bioquímicas: Hemoglobina por el método colorimétrico de la Cianmetahemoglobina, el hematocrito por el método del microhematocrito sobre muestra de sangre total, el hierro sérico por método colorimétrico, la ferritina por la técnica de micro-ELISA, y la transferrina por Inmunodifusión radial simple. Las subpoblaciones linfocitarias fueron procesadas utilizando anticuerpos monoclonales CD1a y CD71 mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta.

Las pruebas de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Inmunología y Análisis Clínico de SEDILAB de la Facultad de Medicina de la UMSS.

Para el análisis de los resultados se utilizó el paquete estadístico Statistical Package System Service (SPSS) versión 9.0.

RESULTADOS y DISCUSION

Se estudiaron 136 niños escolares, cuyas edades

estaban comprendidas entre 5 y 10 años.

Los niños que presentaron una concentración de hemoglobina igual o por debajo de 12,7 g/dL fueron seleccionados para el estudio y recibieron tratamiento diario con sulfato ferroso durante 3 meses. Se determinó una prevalencia de anemia igual al 20% (n=360) mucho menor a la señalada por la Secretaria de Salud que corresponde al 34% de niños anémicos. (gráfica N°1)

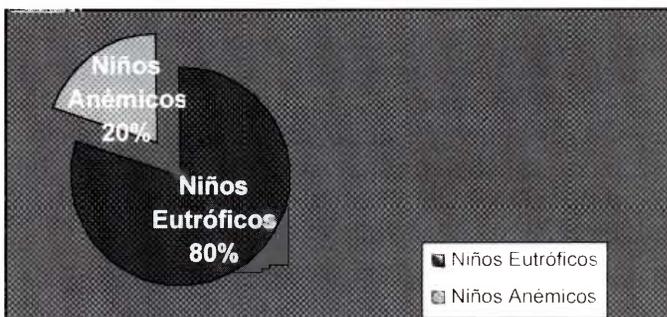


Gráfico 1: Prevalencia de anemia en la población de estudio.

Todos los niños sujetos de estudio fueron sometidos, antes y después del tratamiento a mediciones antropométricas que se detallan en la tabla N°1.

Población de estudio	Edad (meses)	Talla inicial (cm)	Talla final (cm)	Peso inicial (Kg.)	Peso final (Kg.)
Niños anémicos	99,89 +/- 17,74	123,38 +/- 9,57	125,13 +/- 9,54	24,67 +/- 6,12	26,09 +/- 6,72
Grupo Control	98,81 +/- 15,16	120,83 +/- 8,03	122,39 +/- 8,03	23,06 +/- 4,33	23,87 +/- 3,61

Tabla 1: Medidas antropométricas: Talla, peso relacionados con la edad al inicio y al final del tratamiento.

*Promedio +/- Desviación estándar, situados entre la -1 y +1 SD.

La talla inicial promedio de cada grupo de estudio se vió incrementada al final del tratamiento y corresponde al crecimiento normal del niño, de igual manera se incrementó el parámetro peso al final del estudio.

Respetando las recomendaciones internacionales para determinar la población desnutrida, según la Organización Mundial de la Salud, OMS, se consideró la desviación estándar -2 como punto de corte para definir a los niños desnutridos con el indicador antropométrico peso/talla, estos datos fueron relacionados a su vez con las tablas de referencia del NCHS (Nacional Center Health Statistic) utilizadas por el Ministerio de Salud y Deportes para la población de referencia para Bolivia. De acuerdo con este criterio los niños que se encontraron por encima de este valor fueron considerados en el estudio.

El indicador peso para la talla indicó que de los

136 niños que ingresaron al estudio, 60.8% se encontraban dentro de los parámetros normales (situados entre la desviación estándar -1 y + 1, 7.2% considerados en riesgo con el diagnóstico de desnutrición leve (-1 desviación estándar), el 32% de los niños revelaron tendencia hacia la obesidad (situados por encima de desviación estándar +1) de las tablas de referencia. Con el indicador P/E, se observó que 73.6% de los niños se encontraban dentro del rango de normalidad. Utilizando el indicador T/E, 51.2% de los niños presentaron tendencia a ser pequeños para la edad según las tablas de referencia.

En relación a los indicadores bioquímicos y hematológicos, la suplementación de hierro tuvo un efecto positivo y significativo en la población estudiada, los mismos se detallan en la tabla N°2.

Indicador	Niños anémicos	Niños Control	Valores normales
Hemoglobina inicial	11.89 ± 1.08	14.96 ± 1.00	11.5 ± 14.5 g/dL
Hemoglobina final	14.28 ± 1.09		
Hematocrito inicial	38.00 ± 3.15	43.16 ± 2.44	33 – 43 %
Hematocrito final	41.33 ± 1.94		
Hierro sérico inicial	83.19 ± 49.76	114.45 ± 32.94	39 – 136 ug/dL
Hierro sérico final	113.71 ± 53.92		
Ferritina inicial	36.90 ± 31.74	157.33 ± 77.85	30 – 142 ng/dL
Ferritina final	124.12 ± 68.93		
Transferrina inicial	598 ± 80.05	240 ± 50.00	200 – 400 mg/dL

Tabla 2: Indicadores bioquímicos de la población de estudio, antes y después del tratamiento

Promedio +/- Desviación estándar, situados entre la -1 y +1 SD.

*Wallach.J. Interpretación clínica de las pruebas de laboratorio 2003

El grupo de niños anémicos que recibieron suplementación diaria con sulfato ferroso presentaron valores iniciales de hemoglobina de 11.89 ± 1.08 g/dL, cuya concentración se hallaba por debajo del punto de corte de 12.7 g/dL, inferior al valor normal que después de la intervención se vio incrementado significativamente. De igual manera los valores de hematocrito, hierro sérico y ferritina se hallaron por debajo de los valores considerados como normales al inicio del tratamiento para luego incrementarse al final del mismo. Respecto a la concentración de transferrina sus valores fueron

significativamente elevados al inicio del tratamiento para luego disminuir hacia valores normales.

En relación a los indicadores inmunológicos como se observa en la tabla N°3, el grupo de niños anémicos presentaron una población de linfocitos totales de 1490.00 ± 627.67/mm³ que se incrementó significativamente a 1828.6 ± 534.4/mm³ al final del tratamiento.

El promedio de linfocitos que expresan el antígeno de membrana CD71 antes del tratamiento fue de 15.7 ± 3.5%; luego de la intervención se observó una disminución cuyo promedio final fue de 8.1 ± 3.1%. También se observó que los valores de linfocitos inmaduros caracterizados por la clase de diferenciación CD1a mostró un porcentaje inicial de 17.7 ± 3.9% que va disminuyendo significativamente a 8.8 ± 2.5% al final del tratamiento.

Indicadores	Niños Anémicos	Niños Control	Valores Normales
Linfocitos totales Inicial	1490.0 ± 627.6	1560.30 ± 547.30	1800 – 2200/mm ³
Linfocitos totales Final	1828.6 ± 534.4		
CD71 Inicial	15.7 ± 3.5	2.9 ± 1.6	2 – 5 %
CD71 Final	8.1 ± 3.1		
CD1a Inicial	17.7 ± 3.9	3.6 ± 1.8	3 – 5 %
CD1a Final	8.8 ± 2.5		

Tabla 3: Indicadores inmunológicos de la población de estudio, antes y después del tratamiento

Promedio +/- Desviación estándar, situados entre la -1 y +1 SD.

El perfil inmunológico del grupo control muestra una tasa absoluta de linfocitos totales correspondiente a 1560 ± 547.3/mm³ un porcentaje de células inmaduras CD1a de 3.6 ± 1.8% y 2.9 ± 1.6% de las células que expresaban el receptor de transferrina CD71, valores que se encuentran dentro los parámetros normales para la edad.

Estos resultados revelan que el efecto de la suplementación con sulfato ferroso a nivel de las células linfocitarias inmaduras permite reducir su concentración en un porcentaje aproximado de 51%. El porcentaje de células que expresan los antígenos CD1a y CD71 fue significativamente elevado con respecto al grupo control que muestra un rango de 4 a 6.3 % con una diferencia general de 5.14%.

La determinación de los linfocitos totales sirvió para comprobar la existencia o asociación entre anemia y procesos infecciosos que podrían alterar la concentración celular de los linfocitos. Según las tablas de referencia, los valores normales fueron similares al de nuestro grupo control.

Utilizando el test de correlación canónica demos-

tramos que existe una estrecha relación entre la anemia y los procesos infecciosos, considerando que estos procesos son también causa importante de déficit inmunitario, nuestro interés fue encontrar una variable que discriminara mejor la anemia de las infecciones (Tabla N°4).

Step	Tolerante	F to	Wilks'	
		remove	Lambda	
1	CD1a	1.000	103.256	-
2	CD1a	.997	73.658	.652
	Ferritina	.997	47.327	.570
3	CD1a	.979	76.775	.621
	Transferrina	.996	41.992	.519
	Ferritina	.982	9.150	.423
4	CD1a	.978	72.825	.585
	Transferrina	.976	45.015	.506
	Ferritina	.980	9.192	.405
	Linfocitos T totales	.978	6.112	.396
5	CD1a	.978	66.761	.551
	Transferrina	.970	39.384	.475
	Ferritina	.956	10.843	.397
	Linfocitos T totales	.963	4.541	.379
	Hematocrito	.954	4.406	.379

Tabla 4: Análisis discriminante de indicadores bioquímicos e inmunológicos.

Como se observa en la tabla N°4, pudimos demostrar estadísticamente que el antígeno de superficie CD1a que expresan los linfocitos T inmaduros a diferencia de los indicadores bioquímicos, y del receptor para la transferrina CD71, fue el mejor indicador que discriminaba el estado anémico del no anémico sin ser afectado por otros factores asociados al estado carencial.

DISCUSIÓN

La anemia ferropénica constituye el 90% de las anemias de la infancia, siendo en la mayoría de los casos leve o moderada ⁽¹⁵⁾. En Bolivia al igual que en muchos países en vías de desarrollo este porcentaje es mayor alcanzando el 34,7 % de niños afectados ⁽¹⁶⁾.

A esta carencia nutricional se le atribuye la detención del crecimiento pondoestatural, retraso del desarrollo, disminución del vigor físico del niño, disminución de la capacidad de aprendizaje, del coeficiente intelectual y a nivel celular alteración

de la inmunidad celular con reducción de la resistencia a enfermedades infecciosas ^(17,18), lo que implica, como observamos en nuestra población de estudio, una marcada presencia en sangre periférica, de linfocitos T inmaduros, que se correlaciona a una alteración en la blastogénesis de estas células, que nos lleva a considerar que el déficit de hierro incide fundamentalmente a nivel de la maduración linfocitaria.

La importancia del linfocito en el ser humano y su interrelación con el déficit de hierro es motivo de diversas hipótesis que se han ido formulando y son objeto de numerosos trabajos, los datos actuales nos permiten señalar la existencia de perturbaciones de la respuesta inmune en un contexto de carencia de hierro. Si bien la alteración de la respuesta frente a patógenos es la más convincente; sin embargo es también importante mencionar que las alteraciones a nivel de la diferenciación y proliferación celular es una de los efectos más graves de esta deficiencia. ⁽¹⁹⁾.

En nuestro trabajo si bien no utilizamos pruebas específicas para comprobar la proliferación de células T pudimos confirmar el déficit de células inmunocompetentes circulantes que están expresadas en los linfocitos T de los niños anémicos, la presencia de un elevado porcentaje de células que expresan el antígeno de superficie CD1a confirman este hecho que nos permite concluir, que el deterioro de la respuesta inmune asociada a la deficiencia de hierro, no se debe exclusivamente a una alteración en la función endocrina tímica, porque luego de la suplementación con sulfato ferroso se observa además del restablecimiento de los indicadores bioquímicos, una significativa correlación entre la disminución de linfocitos inmaduros circulantes y la desaparición de los receptores de transferrina (CD71) sobre la superficie celular de los mismos, este hecho confirma que la dosis empleada en el tratamiento con sulfato ferroso tuvo un efecto positivo sobre la respuesta inmune celular y la expresión de receptores de transferrina (CD71) depende de la concentración de hierro en el citoplasma celular que se incrementa en deficiencia de hierro y disminuye al corregirse ésta. Finalmente pudimos demostrar estadísticamente, que los indicadores inmunológicos discriminan mejor al niño anémico del no anémico, y descartan la presencia de infección que podría afectar los resultados. El antígeno de superficie CD1a seguido del valor absoluto de linfocitos T, la transferrina, ferritina y hematocrito son los mejores indicadores para discriminar los pacientes anémicos de los no anémicos, la hemoglobina, el hierro sérico y

el receptor de transferrina no presentaron el mismo comportamiento.

Estos resultados abren nuevas perspectivas para realizar más estudios que permitan integrar los aspectos nutricionales, bioquímicos e inmunológicos con marcadores sensibles del estatus del hierro y de otros micronutrientes que correlacionen carencias con la disfunción del sistema inmunológico.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio no podría haberse realizado sin la colaboración de los maestros, los padres de familia y especialmente los niños de las escuelas estudiadas.

Este proyecto fue financiado por el Instituto de Medicina Tropical de Amberes, Bélgica.

BIBLIOGRAFÍA

1. DEMAAYER E., ADIELS-TEGMAN M. The prevalence of anaemia in the world. *World Health Statist Q* 1985;38:302-316.
2. AGUDELO G.M., CARDONA O.L., POSADA M., MONTOLYA M.N., OCAMPO N.E., MARÍN C.M. et al. Prevalencia de anemia ferropénica en escolares y adolescentes, Medellín, Colombia, 1999. *Rev Panam Salud Publica* 2003;13(6):376--386.
3. QUIZHPE E., SAN SEBASTIÁN M., HURTIG A.K., LLAMAS A. Prevalencia de anemia en escolares de la zona amazónica de Ecuador. *Rev Panam Salud Publica* 2003;13(6):355-361.
4. FOMON S.J., VÁSQUEZ GARIBAY E. Prevención de la deficiencia de hierro y la anemia por ésta durante los primeros cinco años de la vida. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2001;58: 341--350.
5. OLIVARES M., WALTER T., HERTRAMPF E., PIZARRO F. Anaemia and iron deficiency disease in children. *Br Med Bull* 1999; 55: 534-548.
6. OLIVARES M. Anemia ferropriva. En: Meneghello J, Fanta E, Paris E, Puga T, eds. *Pediatría*. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1997, p.1745-1749.
7. DALLMAN P.R. Iron deficiency and related nutritional anemias. En: Nathan D.G., Oski F.A., eds. *Hematology of infancy and childhood*. 4th edition. WB Saunders, Philadelphia, 1993, p. 413-50.
8. CUNNINGHAM-RUNDLES S., MCNEELEY D., MOON A. Mecanismos de modulación de la Respuesta inmune por los nutrientes *Journal Allergy Clin Immunol* 115:(6).1119-28, 2005
9. POL TIG LEK. Various parameters of humoral and cellular immunity in children with iron deficiency *Jul* 23-30;44(30-31)719
10. THO SIENSEN K. The transferrin receptor: Its Diagnostic value and its Potential Therapeutic Target. *Scand. J. Clin. Lab Invest Suppl* 1993; 215:113-20
11. VERNET M. The transferrin Receptor: Its role in metabolism and its diagnostic utility. *Ann Biol Clin (Paris)* 1999 Jan-Feb; 57(1):9-8
12. COOK J.D. Iron Deficiency Anaemia *Baillieres Clin Haematol* 1994 Dec;7(4):787-804
13. IACOPETTA B., MORGAN E., YEOH G. Transferrin receptors and iron uptake during erythroid cell development. *Biochim Biophys Acta*. 1982;687:204-210.
14. CALLUS B., IACOPETTA B., KUHN L., MORGAN E. Effects of overexpression of the transferrin receptor on the rates of transferrin recycling and uptake of non-transferrin-bound iron. *Eur J Biochem*. 1996;238:463-469.
15. ACC/SNC, 4th Report on The world nutrition situation. Nutrition throughout the life cycle. United Nations Administrative Committee on Coordination. Sub-Committee on Nutrition (ACC/SCN), in collaboration with International Food Policy Research Institute. Geneva, 2000.
16. Sistema Regional de datos básicos en Salud - Perfil de país - Resumen del Análisis de Situación y Tendencias de Salud - Bolivia - Versión actualizada al 9 de noviembre de 2004, La Paz Bolivia.
17. OLIVARES M., WALTER T., HERTRAMPF E., PIZARRO F. Anaemia and iron deficiency disease in children. *Br Med Bull* 1999; 55: 534-548.
18. VÁSQUEZ GARIBAY EDGAR M. La anemia en la infancia *Rev Panam Salud Publica* vol.13 no.6 Washington June 2003.
19. OLIVARES M, WALTER T. Consecuencias de la deficiencia de hierro. *Rev Chil Nutr* 2003;30:226-233.
20. WALLACH J. Interpretación Clínica de las Pruebas de Laboratorio, 4ª edición, Editorial Masson, 2003