

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
CENTRO DE QUÍMICA ANALÍTICA



**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**  
**DETERMINACIÓN DE Zn, Pb, Cd, Cu, Cr, Se Y Hg EN CABELLO Y ORINA DE NIÑOS**  
**CON SÍNDROME DE ESPECTRO AUTISTA MEDIANTE TÉCNICAS DE**  
**ESPECTROSCOPIA ATÓMICA**

---

**TUTOR: DR. JOSÉ CHIRINOS**

Trabajo Especial de Grado  
presentado ante la ilustre Universidad  
Central de Venezuela, por la  
Br. Emil J. Castillo V., para optar al  
título de Licenciada en Química

**CARACAS, MAYO DE 2010**

## Resumen

---

Se determinó la concentración de elementos traza como Zn, Cu, Cr, Se, Cd, Pb y Hg en muestras de cabello y orina con 24 horas de recolección en niños con Síndrome de Espectro Autista con edades comprendidas entre 3 y 16 años, pertenecientes al Hospital J. M. de los Ríos y al Hospital Pérez Carreño y de una población de grupo control (niños sanos) pertenecientes, en su mayoría, a la Gran Caracas.

Se analizaron en total 21 muestras de orina y 42 muestras de cabello de niños con Síndrome de Espectro Autista. Adicionalmente, se analizaron 9 muestras de orina y 8 muestras de cabello de niños pertenecientes a un grupo control.

La determinación de Zn, Cu, Cr, Se, Cd y Pb se realizó mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES) y la determinación de Hg total se realizó mediante espectrometría de absorción atómica con generación de vapor frío (CV-AAS). Finalmente, se determinó creatinina en orina mediante espectrometría ultravioleta – visible. Los resultados obtenidos fueron tratados estadísticamente empleando el programa Statgraphic Plus versión 5.0.

Las concentraciones de los elementos en cabello y orina de niños con Síndrome de Espectro Autista y pertenecientes al grupo control, fueron comparadas con intervalos de referencia internacional. Para las muestras de orina, las concentraciones de Zn, Se y Hg de niños autistas estuvieron dentro del intervalo de las concentraciones de referencia, el Cu y el Pb presentaron niveles por encima de los valores referenciales y el Cr se encontró superior a estos niveles. Para una población sana, las concentraciones de Cr y Hg estuvieron dentro de los valores referenciales, mientras que Cu y Se se

ubicaron por encima de los mismos y finalmente las concentraciones de Zn por debajo y Pb se encontraron por encima de los valores de referencia.

Los valores de las concentraciones de Se, Cr y Hg se encontraron dentro del rango referencial en muestras de cabello de niños autistas, mientras que las concentraciones de Pb se ubicaron por encima y las de Zn y Cu por debajo de los mismos. Para el cabello, se encontró que sólo el Hg estuvo dentro del intervalo de referencia en la población sana, los elementos Se, Cr y Pb se hallaron por encima, finalmente los valores obtenidos de las medianas para el Zn y el Cu, estuvieron por debajo de los valores de referencia.

Se compararon las tendencias encontradas para cada elemento en niños autistas con respecto a una población control observándose que, tanto para la orina como para el cabello la eliminación de Cu y Pb fue mayor en niños autistas que sanos. Por otro lado, la de Se, Cr y Hg fue mayor en la población control que en la autista por ambas vías y la excreción de Zn en orina fue mayor en autistas que sanos y caso contrario ocurrió con el cabello.

Finalmente se establecieron relaciones entre elementos como Se/Zn, Cu/Se y Cu/Zn en las muestras de orina indicando que las tendencias de concentraciones de los dos primeros eran inversamente proporcionales mientras que para la relación Cu/Zn fue directamente proporcional.

# Índice de Contenido

<b>1.- Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>2.- Marco Teórico.....</b>	<b>4</b>
<b>2.1.- Trastornos o síndromes del espectro- autista .....</b>	<b>4</b>
2.1.1.- Historia del Autismo .....	4
2.1.2.- Autismo .....	5
2.1.3.- Espectro Autista .....	6
2.1.4.- Trastornos o Síndromes Relacionados .....	7
2.1.5.- Signos Presentados por Niños Autistas .....	10
2.1.6.- Incidencia .....	11
2.1.7.- Etiología o Causas del Trastorno Espectro Autista .....	12
<b>2.2.- Papel que juegan los elementos traza en el organismo .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3.- Creatinina.....</b>	<b>26</b>
<b>2.4.- Tratamientos para el autismo .....</b>	<b>28</b>
2.4.1.- Quelación en autismo.....	28
2.4.2.- Dieta libre de gluten y caseína .....	29
<b>3.- Estudios realizados sobre la incidencia de los elementos traza y su relación con el autismo</b>	<b>31</b>
<b>4.- Técnicas analíticas empleadas para la determinación de elementos traza en cabello y orina de niños con síndrome espectro autista.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.- Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP, Inductively Coupled Plasma) .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.- Espectrofotometría De Absorción Atómica Con Generación De Vapor Frío (CV-AAS).....</b>	<b>38</b>
<b>4.3.- Espectrometría Ultravioleta-Visible.....</b>	<b>38</b>
4.3.1.- Aplicaciones.....	39
<b>5.- Justificación y Objetivos .....</b>	<b>41</b>
<b>6.- Parte Experimental .....</b>	<b>42</b>
<b>6.1.- Instrumentación .....</b>	<b>42</b>
6.1.1.- Plasma Óptico Inductivamente Acoplado (ICP-OES) .....	42
6.1.2.- Espectrofotómetro de Absorción Atómica con Generación de Vapor Frío (CV-AAS) .....	44
6.1.3.- Espectrómetro Uv-Visible.....	45
6.1.4.- Extracción con Sonda de Ultrasonido (UPS, Ultrasound Probe Sonication).....	46
<b>6.2.- Reactivos y materiales a usar .....</b>	<b>45</b>
6.2.1.- Digestión De Cabello .....	48
6.2.2.- Preparación De Patrones Multielementales .....	48
6.2.3.- Digestión De Orina .....	48
6.2.4.- Determinación de Creatinina .....	49

<b>6.3.- Metodología Experimental.....</b>	<b>49</b>
6.3.1.- Análisis de muestras de orina de niños con síndrome espectro autista .....	49
6.3.2.- Análisis de muestras de cabello de niños con síndrome espectro autista .....	51
6.3.3.- Tratamiento de muestras y Metodología para determinar creatinina en orina 24 horas mediante Espectrometría Uv-Visible <sup>41</sup> .....	54
<b>7.- Discusión de Resultados .....</b>	<b>56</b>
<b>7.1.- Comparación de elementos traza en muestras de orina de niños con Síndrome Espectro Autista     y control con respecto a los valores de referencia .....</b>	<b>56</b>
<b>7.2.- Comparación de elementos traza en muestras de cabello de niños con Síndrome Espectro     Autista y control con respecto a los valores de referencia.....</b>	<b>58</b>
<b>7.3.- Comparación de las concentraciones de elementos en cabello y orina en poblaciones autistas y     control. ....</b>	<b>60</b>
<b>7.4.- Comparación de las concentraciones de los elementos en muestras de cabello con respecto a     muestras de orina 24 horas .....</b>	<b>69</b>
<b>7.5.- Relaciones entre elementos en orina y cabello en diagramas de cajas y bigotes .....</b>	<b>73</b>
<b>8.- Conclusiones .....</b>	<b>75</b>
<b>9.- Referencias Bibliográficas .....</b>	<b>76</b>
<b>10.- Apéndices .....</b>	<b>77</b>

## Índice de Figuras

---

<b>Figura 1.</b> Resumen gráfico del Síndrome Espectro Autista_____	<b>10</b>
<b>Figura 2.</b> Algunos signos presentados por niños autistas_____	<b>11</b>
<b>Figura 3.</b> Resumen de etiología o causas del Espectro Autista_____	<b>17</b>
<b>Figura 4.</b> Fuente de plasma acoplado inductivamente_____	<b>36</b>
<b>Figura 5.</b> Nebulizador para la inyección de la muestra en una fuente de plasma_____	<b>37</b>
<b>Figura 6.</b> Espectrómetro de ICP-OES_____	<b>42</b>
<b>Figura 7.</b> Espectrómetro de absorción atómica con generación de vapor frío, marca Perkin Elmer, modelo FIMS-100_____	<b>44</b>
<b>Figura 8.</b> Espectrofotómetro UV- Visible_____	<b>46</b>
<b>Figura 9.</b> Equipo de baño de Ultrasonido_____	<b>47</b>
<b>Figura 10.</b> Esquema de procedimiento experimental para la digestión de orina 24 horas_____	<b>51</b>
<b>Figura 11.</b> Esquema de procedimiento experimental para la digestión del cabello_____	<b>53</b>
<b>Figura 12.</b> Esquema de procedimiento experimental para el tratamiento de creatinina en orina 24 horas_____	<b>55</b>
<b>Figura 13.</b> Diagrama de barras de comparación entre niños autistas y sanos en orina 24 horas para elementos esenciales_____	<b>61</b>
<b>Figura 14.</b> Diagrama de barras de comparación entre niños autistas y sanos en orina 24 horas para elementos no esenciales_____	<b>63</b>
<b>Figura 15.</b> Diagrama de barras de comparación entre niños autistas y sanos en cabello para elementos esenciales_____	<b>64</b>
<b>Figura 16.</b> Diagrama de barras de comparación de medianas de concentraciones entre niños autistas y sanos en cabello para elementos no esenciales_____	<b>66</b>
<b>Figura 17.</b> Diagramas de cajas y bigotes de las concentraciones de cabello y orina para Se, Zn y Cu_____	<b>70</b>

**Figura 18. (Continuación)** Diagramas de cajas y bigotes de las concentraciones de cabello y orina para Cr, Pb y Hg\_\_\_\_\_71

**Figura 19.** Relación Se/Zn, Cu/Zn y Se/Cu en orina\_\_\_\_\_73

## Índice de Tablas

---

- Tabla 1.-** Condiciones de operación del equipo ICP-OES y longitudes de onda de trabajo \_\_\_\_\_ **43**
- Tabla 2.-** Condiciones de operación del equipo para la determinación de Hg en las muestras\_ **45**
- Tabla 3.-** Distribución de concentraciones de Zn, Cu, Se, Cr, Pb, Cd y Hg en muestras de orina 24 horas de una población de niños con Síndrome de Espectro Autista y grupo control \_\_\_\_\_ **56**
- Tabla 4.-** Distribución de concentraciones de Zn, Cu, Se, Cr, Pb, Cd y Hg en muestras de cabello de una población de niños con Síndrome de Espectro Autista y grupo control \_\_\_\_\_ **59**
- Tabla 5.-** Comparación de medianas de los elementos en cabello y orina de niños autistas con respecto a los sanos \_\_\_\_\_ **72**

## 1.- Introducción

---

El Trastorno del Espectro Autista (TEA) es un desorden del desarrollo que afecta múltiples aspectos funcionales del niño. El trastorno se caracteriza por demoras en las habilidades comunicativas, afección en la interacción social y en los juegos imaginativos, y síntomas conductuales que implican comportamientos repetitivos y/o un rango restringido de interés en actividades. Aunque no hay una causa única conocida del autismo, hay pruebas que indican que el autismo puede ser causado por una variedad de problemas: factores genéticos por exceso de péptidos exógenos (proteínas ajenas al organismo) por deficiencia de peptidasas, defectos del tallo cerebral, envenenamiento por plomo, defectos del proceso de la mielinización (aislamiento de las fibras nerviosas), alergias alimentarias, infecciones por Hongos (Levaduras) y la intoxicación por metales como Cu, Zn, Hg, Al y Pb.

Existen numerosos estudios dedicados a la búsqueda de información contundente respecto a los mecanismos que intervienen en la aparición del Síndrome, entre ellos aquellos que buscan determinar la posible influencia de los elementos traza en el desarrollo del autismo. Hoy en día se conoce mucho más sobre los efectos de estos elementos, cuya exposición está relacionada con problemas de salud como retrasos en el desarrollo, varios tipos de cáncer, daños en el riñón, e incluso, con casos de muerte. La relación con niveles elevados de Hg, Au y Pb ha estado asociada al desarrollo de la auto inmunidad (el sistema inmunológico ataca a sus propias células tomándolas por invasoras). La auto-inmunidad puede derivar en el desarrollo de dolencias en las articulaciones y el riñón, tales como la artritis reumática, y en enfermedades de los sistemas circulatorio o nervioso central.

Hoy en día, uno de los exámenes utilizados por los médicos venezolanos, para evaluar el contenido de elementos traza, es el análisis del cabello, que refleja la carga metálica del organismo. También, se puede realizar el examen de sangre para evaluar la intoxicación aguda y el examen de orina y heces es para conocer la cantidad de metales pesados que se están excretando.

Son muchas las opiniones encontradas respecto a la utilidad del análisis del cabello. Se reporta que tiene las siguientes ventajas: puede contener niveles relativamente altos de sustancias peligrosas de potencial interés, incluidos los elementos y algunos compuestos orgánicos, no es un método invasivo y se trata de una muestra estable. También, se han confirmado las siguientes limitaciones: la falta de precisión y la exactitud de los resultados, contaminación externa, las variaciones interindividuales, la falta de correlación con los efectos en la salud, y la falta de intervalos de referencia confiables.

Por todo lo antes mencionado, en este trabajo, se plantea la evaluación de las metodologías para la determinación de la concentración de elementos traza en cabello y orina de niños de espectro autista, que puedan llegar a formar parte de los exámenes de rutina de los médicos venezolanos. Es de suma importancia establecer los niveles de referencia de los elementos traza en los niños que permitan establecer las posibles correlaciones entre la concentración metálica en el organismo de los infantes y la etiología del síndrome de espectro autista.

## 2.- Marco Teórico

---

### 2.1.- Trastornos o síndromes del espectro- autista

#### 2.1.1.- Historia del Autismo

La palabra *autismo*, proviene del griego *auto* de autós, "propio, uno mismo", ésta fue utilizada por primera vez por el psiquiatra suizo Eugene Bleuler, en un tomo del *American Journal of Insanity* en 1912.

La clasificación médica del autismo no ocurrió sino hasta 1943 cuando el Dr. Leo Kanner del Hospital John Hopkins estudió a un grupo de 11 niños e introdujo la caracterización *autismo infantil temprano*. Al mismo tiempo, un científico Austriaco, el Dr. Hans Asperger, utilizó coincidentemente el término *psicopatía autista* en niños que exhibían características similares. El trabajo del Dr. Asperger, sin embargo, no fue reconocido hasta 1981 (por medio de Lorna Wing), debido principalmente a que fue escrito en alemán.<sup>1,2,3</sup>

Las interpretaciones del comportamiento de los grupos observados por Kanner y Asperger fueron distintas. Kanner reportó que 3 de los 11 niños no hablaban y los demás no utilizaban las capacidades lingüísticas que poseían. También notó el comportamiento auto-estimulador y "extraños" movimientos de aquellos niños. Por su lado Asperger notó, más bien, sus intereses intensos e inusuales, su repetitividad de rutinas, y su apego a ciertos objetos que era muy diferente al autismo de alto rendimiento ya que en el Asperger todos hablan. Indicó que algunos de estos niños hablaban como "pequeños profesores" acerca de su área de interés, y propuso que para tener éxito en las ciencias y el arte.<sup>1,2</sup>

Aunque tanto Hans Asperger como Leo Kanner posiblemente NO observaron la misma condición, sus diferentes interpretaciones llevaron a la formulación de Síndrome de Asperger (término utilizado por Lorna Wing en una publicación en 1981) y lo que lo diferenciaba al *autismo de Kanner*.<sup>1,2,3</sup>

### **2.1.2.- Autismo**

El autismo (o espectro autista) es un desorden neuro-conductual –hereditario y heterogéneo del desarrollo del cerebro, que comienza en niños menores de tres años de edad y que deteriora su comunicación e interacción social causando un comportamiento restringido y repetitivo. Pueden jugar un papel en estos síndromes, algunas anormalidades cromosómicas. Las soluciones ni son simples ni uniformes en los diferentes síndromes, que algunas veces se asocian con patologías conocidas como el síndrome de Down, rubéola congénita, síndromes de Rett o de la X frágil, entre otros.

Con frecuencia se califica el autismo como un trastorno del espectro a causa de la variedad de características y el rango de severidad que es único para cada niño. Aunque los menores diagnosticados con trastorno del espectro autista tienen una serie de características conductuales comunes, no hay dos individuos idénticos. Cada uno puede actuar de forma muy diferente respecto al otro, así como tener una variada serie de habilidades. Hacia el extremo más atenuado del espectro, los niños pueden relacionarse cómodamente con miembros de la familia; mientras que hacia el extremo más severo del espectro, los niños pueden estar retraídos socialmente en casi todas las situaciones. Los menores con trastorno del espectro autista pueden presentar síntomas diferentes a través del tiempo o de una situación a otra.<sup>4,5</sup>

### 2.1.3.- Espectro Autista

El espectro autista (o también espectro autístico) es un conjunto de síndromes del desarrollo y el comportamiento que resultan de ciertas combinaciones de rasgos autistas. Aunque estos rasgos se pueden distribuir normalmente en la población, algunos individuos heredan o manifiestan más rasgos autistas. En la parte más baja y más grave del espectro se encuentra el autismo de bajo funcionamiento o *autismo de Kanner*, que se caracteriza por profundas discapacidades en varias áreas. En la parte más alta (y por lo tanto, menos grave) del espectro nos encontramos con el autismo de alto funcionamiento y el síndrome de Asperger.<sup>5</sup>

El autismo y otros trastornos generalizados del desarrollo se deben en gran parte a factores genéticos. En algunos casos el autismo es un aspecto de una condición genética identificable. Sin embargo, con mayor frecuencia no es posible determinar una causa subyacente específica; este es el llamado autismo idiopático, o sea autismo de causa desconocida. Existe abundante evidencia en favor de que el autismo idiopático es causado por cambios o 'mutaciones' en los genes. Sin embargo, esos genes aún están por identificar.<sup>4,5</sup>

El trastorno del espectro autista y trastorno generalizado del desarrollo son sinónimos, pero cabe realizar una distinción. TGD se refiere a los desórdenes del desarrollo psicológico y de conducta que abarcan muchas áreas de funcionamiento: lenguaje y comunicación, habilidades de autoayuda, coordinación motriz, función ejecutiva, y logros académicos. La categoría nosológica de trastornos generalizados del desarrollo comprende síndromes que, etiológicamente, pueden no tener relación con el autismo, siendo el comportamiento autista sólo una parte del trastorno: es el caso del síndrome desintegrativo de la infancia y el síndrome de Rett.

Hoy se utiliza la palabra "Autismo" para referirse a diferentes discapacidades como son, "Síndrome Autista", "Trastorno Profundo del Desarrollo", "Síndrome de Asperger" y aunque hay algunas diferencias entre estos trastornos, ellos son muy similares y aquellos que los sufren, experimentan muchas de las mismas dificultades durante su vida. Actualmente se habla del autismo como un continuum y por eso se ha tomado el término "Trastornos del Espectro Autista" donde se incluyen desde "Trastornos de Déficit de Atención" hasta el "Autismo":<sup>4,5</sup>

- Trastornos de Déficit de Atención (TDA )
- Trastornos de Déficit de Atención con "hiperactividad" (TDAH)
- Trastornos de Aprendizaje (TA)
- Trastornos Profundos de Desarrollo (TPD)
- AUTISMO

#### 2.1.4.- Trastornos o Síndromes Relacionados

**Síndrome de Asperger:** es uno de los trastornos generalizados del desarrollo. Se trata de un síndrome conocido por formar parte del espectro de los trastornos autísticos. El término síndrome de Asperger fue propuesto por Lorna Wing en 1981, en honor al psiquiatra y pediatra austriaco Hans Asperger. Las personas neurotípicas (que no sufren este trastorno) poseen inteligencia interpersonal (empatía), es decir que son capaces de reconocer los estados emocionales ajenos. La mayoría de los seres humanos puede asociar información acerca de los estados cognitivos y emocionales de otras personas basándose en pistas otorgadas por el entorno y el lenguaje corporal. Las personas con síndrome de Asperger, en cambio, no poseen esta habilidad (no son empáticas). Las personas con SA en general son incapaces de "leer entre líneas", es decir, se les escapan las implicaciones ocultas en lo que una persona dice de forma directa y verbal.<sup>4</sup>

**Síndrome de Rett:** es una grave patología neurológica, que se presenta casi exclusivamente en las niñas y se puede diagnosticar erróneamente como autismo o parálisis cerebral. Los estudios han asociado muchos casos de síndrome de Rett con un defecto en el gen de la proteína 2 de unión a metil-CpG (MeCP2). El gen se encuentra en el cromosoma X. Las mujeres tienen dos cromosomas X, así que aun cuando uno presenta este defecto significativo, el otro cromosoma es lo suficientemente normal para que la niña sobreviva. Los varones nacidos con esta mutación no tienen un segundo cromosoma X para compensar el problema, por lo tanto, el defecto generalmente ocasiona aborto espontáneo, mortinato o muerte muy prematura. La enfermedad es congénita, aunque no es evidente en un primer momento, y se manifiesta durante el segundo año de vida y, en todo caso, dentro de los 4 primeros años. Afecta aproximadamente a 1 persona por cada 10000. Pueden observarse graves retrasos en la adquisición del lenguaje y en la adquisición de la coordinación motriz. A menudo, está asociado con retraso mental grave o leve. La pérdida de las capacidades es por lo general persistente y progresiva. Este síndrome provoca graves discapacidades a muchos niveles, causando al enfermo ser dependiente de los demás para toda la vida. Toma su nombre de Andreas Rett, el profesor que primero la describió y la estudio, en 1966.<sup>4</sup>

**Trastorno Generalizado del Desarrollo No Especificado (TGDNE):** el diagnóstico de TGDNE se considera con frecuencia en niños que presentan manifestaciones de autismo que no satisfacen los criterios diagnósticos para ninguno de los otros trastornos generalizados del desarrollo (TGDs).<sup>4</sup>

**Trastorno Desintegrativo Infantil:** se caracteriza por una marcada regresión en varias áreas de funcionamiento, después de al menos, dos años de desarrollo normal. Se conoce también como Síndrome de Hedller y psicosis desintegrativa, describiéndose

como un deterioro a lo largo de varios meses de funcionamiento intelectual, social y lingüístico en niños de 3 y 4 años con funciones previas normales. Característicamente pierden el lenguaje, el interés en el ambiente social, a menudo también las habilidades para el aseo y el cuidado personales, e igualmente pueden perder el interés por el ambiente.<sup>4</sup>

**Trastorno por Déficit de Atención con o sin Hiperactividad TDA (H):** este trastorno es diagnosticado con evidente incremento en los últimos años, tanto en niños, jóvenes y adultos. Se usa el término de Trastorno por déficit de atención con o sin hiperactividad (TDAH) para describir un trastorno del comportamiento que se puede presentar tanto en la infancia, en la adolescencia y en la edad adulta. Este trastorno implica una dificultad generalizada en el espacio y el tiempo para mantener y regular la atención, y una actividad motora excesiva, secundariamente, se manifiesta en forma de una falta de reflexividad, actuando con impulsividad. Estos individuos se presentan ante los demás como personas con escaso autocontrol, dejándose llevar con frecuencia por sus emociones, deseos o necesidades.<sup>4</sup>

Como se indica en la figura 1, el término "Espectro Autista" engloba diferentes síndromes o trastornos donde se incluyen desde "Trastornos de Déficit de Atención" hasta el "Autismo".



**Figura 1.** Resumen gráfico del Síndrome Espectro Autista

### **2.1.5.- Signos Presentados por Niños Autistas**

En la figura 2 se muestran algunos de los signos indicadores más notorios presentados por los niños con Síndrome Espectro Autista, como por ejemplo lo son el aislamiento, evitan el contacto físico, no responden a su nombre, se apegan a objetos, entre otros. Esto aunque un diagnóstico de Autismo debe ser dado por un especialista.



**Figura 2.** Algunos signos presentados por niños autistas

### 2.1.6.- Incidencia

Se estima que el autismo afecta a cuatro de cada 1.000 habitantes, dependiendo del criterio de diagnóstico usado. Se cree que la incidencia está en aumento pero no está claro si eso se debe a un aumento real de casos o simplemente a un mayor número de diagnósticos. El autismo afecta cuatro veces más a los hombres que a las mujeres, y se puede encontrar en todo el mundo, sin importar raza, cultura, características de los padres o nivel económico.<sup>5</sup>

El autismo varía grandemente en severidad. Los casos más severos se caracterizan por una completa ausencia del habla de por vida, comportamiento extremadamente repetitivo, no usual, auto dañino y agresivo. Este comportamiento puede persistir por mucho tiempo y puede ser muy difícil de cambiar, siendo un reto enorme para aquellos que deben convivir, tratar y educar a estas personas. Las formas más leves de autismo (típicamente autismo de alto rendimiento) pueden ser casi imperceptibles y suelen confundirse con timidez, falta de atención y excentricidad. Cabe notar que una persona autista puede ser de alto funcionamiento en ciertas áreas y de bajo funcionamiento en otras. Por ejemplo, existen personas autistas que carecen de habla pero pueden comunicarse por escrito muy elocuentemente.<sup>5</sup>

### **2.1.7.- Etiología o Causas del Trastorno Espectro Autista**

El Autismo no tiene una causa específica, sino más bien una combinación de características conductuales anormales. Aunque por largo tiempo se ha sospechado de una base genética para muchos casos de autismo, sólo recientemente los investigadores han podido vincular a genes específicos con el autismo.<sup>4,5</sup>

Se han encontrado desórdenes metabólicos en algunos casos de autismo. Además, en los niños con autismo se han encontrado defectos en la descomposición de los péptidos (proteínas simples tales como la insulina, las endorfinas, y otros neurotransmisores) durante el proceso digestivo, según fue indicado por un aumento del nivel de péptidos en la orina.<sup>4,5</sup>

Este trastorno es multifactorial, no habiéndose encontrado hasta ahora una causa única, sin embargo se distinguen otras de las posibles causas de este trastorno:

**1. Genética:** Aunque se sabe que la herencia ejerce un papel mayor en trastornos comportamentales complejos como el autismo, la identificación de genes específicos que confieren vulnerabilidad a tales trastornos ha sido en extremo difícil. Detectar múltiples genes, cada uno de los cuales sólo ejerce un pequeño efecto, requiere muestras de amplio tamaño y tecnologías potentes capaces de asociar variaciones genéticas con la enfermedad y localizar con precisión los genes candidatos. Incluso después de que se han encontrado los genes de vulnerabilidad para enfermedades humanas, se requieren técnicas sofisticadas para establecer qué hace que los genes se activen, cuáles componentes cerebrales codifican, y cómo afectan el comportamiento. Aunque no está asegurada, la posibilidad de adquirir tal conocimiento molecular es una gran promesa para la creación de nuevos tratamientos. La teoría que prevalece en la actualidad entre los investigadores en genética del autismo apoya la idea de herencia 'compleja'. Esto significa que múltiples factores genéticos probablemente están implicados, y pueden predisponer a un individuo a desarrollar el autismo. Esta teoría también incluye la influencia de los factores ambientales. Además de tener la combinación justa de genes relacionados con el autismo, la exposición ciertos factores ambientales podrían ser necesaria para que el autismo se desarrolle en algunos individuos. Por ejemplo, si una versión de un gen hace que un individuo sea susceptible a una sustancia química particular, la exposición a esa sustancia puede desencadenar el desarrollo del autismo. Al enfocarse en el estudio de factores genéticos y determinar sus mecanismos subyacentes, los investigadores podrán determinar con mayor exactitud los factores ambientales que participan en al autismo. <sup>4,5</sup>

**2. Ambiental.** Toxicidad por:

- Metales Pesados
- Químicos

### 3. Alteración / Desintoxicación Hepática

- Alteración Sulfatación
- Disminución Glutación (enzima Glutation Peroxidasa (GSH-Px), donde el selenio forma parte de ésta, la cual ejerce una acción antioxidante)<sup>5</sup>

### 4. Gastrointestinal

- Mala digestión
- Péptidos Opioides
- Intestino permeable
- Disbiosis
- Levaduras
- Bacterias anaeróbicas
- Parásitos
- Viral

**5. Alergias Alimentos/ Sensibilidades:** Reportes sugieren que las sensibilidades a ciertos alimentos, especialmente al trigo, azúcar, y leche de vaca, pueden contribuir a los problemas conductuales. Debido a que muchos autistas tienen alergias alimentarias, esos alérgenos deben ser identificados y eliminados de la dieta. La mayoría de los alergólogos entrenados de la manera tradicional no están al tanto de que las alergias pueden afectar al cerebro.<sup>5</sup>

### 6. Bioquímica. Deficiencia de:

- Vitaminas

- Minerales
- Ácidos Grasos
- Aminoácidos

**7. Neural:** Estudios han vinculado a defectos del tallo cerebral (tamaño del tallo cerebral significativamente disminuido) con el autismo.

Un defecto del proceso de la mielinización (aislamiento de las fibras nerviosas): Esto puede ser responsable no sólo de los síntomas autistas, sino también del desarrollo frecuente de epilepsia en niños autistas mayores.<sup>5</sup>

- Neuroquímico

## **8. Metabólico**

- Disfunción mitocondrial

## **9. Infecciones:**

- **Viral:** Rubéola, o cytomegalovirus (relacionados con el virus del herpes) durante el embarazo de la madre, y severas infecciones durante la infancia, pueden estar asociadas con la aparición del autismo.<sup>5</sup>

- **Bacteriana:** por hongos (levaduras): muchos niños desarrollan autismo luego de seguir tratamientos con antibióticos por causa de infecciones frecuentes de oídos. Se cree que el uso crónico de antibióticos destruye a las bacterias que normalmente viven en el tracto intestinal, lo cual conduce a una proliferación de la levadura *Cándida albicans* así como también al "síndrome del intestino permeable", en el que las

partículas de alimentos no digeridos pasan al torrente sanguíneo, provocando reacciones auto inmunes y alergias alimentarias, que son comunes en los autistas.<sup>5</sup>

- Micótica
- Parasitaria

## 10. Inmunológico

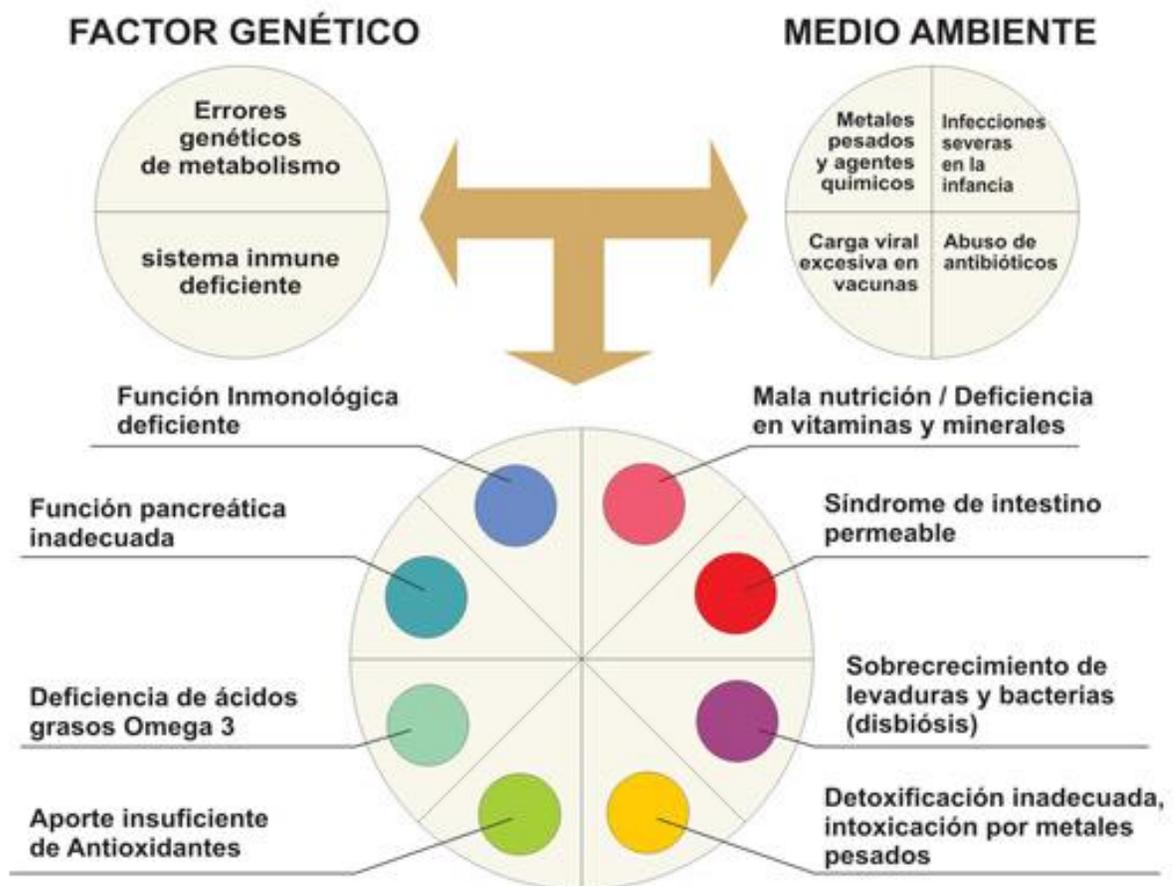
- Deficiencia inmune
- Autoinmunidad

**11. Vacunas infantiles:** se cree que muchas veces el autismo es causado por las vacunas de la infancia, particularmente con la vacuna MMR (por sus siglas en inglés para Measles-Mumps-Rubella o Sarampión, Paperas y Rubéola).<sup>5</sup>

El timerosal, derivado del mercurio, ha sido utilizado en medicina por sus propiedades antisépticas. Desde hace más de 60 años ha sido usado como conservante en vacunas para evitar el sobrecrecimiento bacteriano, especialmente en frascos multidosis. Sin embargo, desde fines de la década de 1990 su uso ha sido cuestionado en Estados Unidos y Europa por el riesgo teórico de exposición en niños pequeños, con sus potenciales efectos en el desarrollo neurológico. Este cuestionamiento motivó a organizaciones internacionales, gubernamentales y no gubernamentales, entre ellas a grupos de asesores de la Organización Mundial de la Salud, desde el año 2001, a revisar la información disponible hasta la fecha. Estos grupos de expertos concluyeron que actualmente no existe evidencia del daño por exposición al mercurio en niños y adultos que reciben vacunas con timerosal y, en consecuencia, no existe razón para cambiar las actuales prácticas de inmunización con vacunas que contienen timerosal.<sup>4</sup>

En la figura 3 se observa un resumen de las múltiples causas del espectro autista, dividiendo éstas en ramas como el factor genético, el medio ambiente (intoxicación con metales pesados, carga viral excesiva en vacunas), entre otras.

## Etiología Multifactorial del Espectro Autista (causas)



**Figura 3.** Resumen de etiología o causas del Espectro Autista

## 2.2.- Papel que juegan los elementos traza en el organismo

En los últimos años, el autismo ha pasado a constituir una especie de crisis de salud pública, como resultado de un aumento significativo en la tasa de personas afectadas (1/500) y, del desconocimiento de las causas que lo originan.

Tal como se expresó anteriormente, se conoce que la incidencia está en aumento, pero no está claro si eso se debe a un aumento real de casos o simplemente a un mayor número de diagnósticos.

En Venezuela, son pocos los análisis de elementos trazas que se han realizado respecto a la relación metal-autismo. Pues, el estudio de metales en niños de espectro autista se ha limitado al análisis de mercurio en bioindicadores como sangre y orina. Esta situación, ha conllevado tanto a médicos como a padres de niños autistas, a buscar alternativas que le suministren la mayor cantidad de información, sobre el estado de los infantes y, en consecuencia, de los tratamientos que mejor se ajusten a sus necesidades.

Es por ello, que se ha planteado la optimización de métodos para la determinación de la concentración de elementos traza en cabello y orina de niños de espectro autista, que puedan llegar a formar parte de los exámenes rutinarios de médicos venezolanos y, que aporten información sobre los factores que pueden estar influyendo en el desarrollo del Síndrome del Espectro Autista.

En el organismo humano se han reconocido como mínimo unos 60 elementos. Se definen como elementos traza aquellos minerales que estén presentes en algún tejido en cantidades oscilando de picogramos a microgramos por gramo de tejido

húmedo. Quince minerales han sido considerados como elementos traza y corresponden a: Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Co, Mo, Se, Cr, I, F, Sn, Si, V y As.<sup>6</sup>

Estos se encuentran en concentraciones muy pequeñas en los tejidos corporales y algunos de ellos son esenciales para el crecimiento óptimo, la salud y el desarrollo de los organismos vivos. De acuerdo a su significado biológico se clasifican en: elementos traza esenciales (oligoelementos), posibles esenciales y no esenciales o tóxicos.<sup>6,7</sup>

Los oligoelementos, se definen como aquellos que se han comprobado mediante experimentos diseñados y corroborados en forma apropiada, necesarios para el rendimiento óptimo de una función específica en el organismo. Pueden estar en dos formas en el cuerpo humano: como iones cargados o unidos a proteínas si se encuentran en la sangre o en otros líquidos celulares. Estos actúan como activadores de enzimas, ejercen labores estructurales y metabólicas, estimulan o inhiben la función hormonal, regulan las respuestas fisiológicas, la velocidad y la calidad de la transmisión nerviosa, entre otros procesos biológicos. Ejemplo de ellos son: Fe, Zn, I, Se, Mn, F, Mo, V, Cu, Cr, Co, Ni, B y Si.<sup>7,8,9</sup>

Se considera que un elemento traza es esencial cuando su deficiencia ocasiona trastornos de algunas funciones determinadas. En los humanos solamente el hierro, zinc, cobre, cromo, selenio, yodo y cobalto se han considerado que fueran necesarios. A través del estudio de algunos casos aislados, se podría presentir que el vanadio y el molibdeno también pueden ser esenciales.<sup>6,7</sup>

Los elementos traza circulan en el organismo como complejos unidos a las proteínas, que no siempre esté en un libre equilibrio con los depósitos de los tejidos. En la actualidad hay dos grupos de elementos esenciales.<sup>6,7,8,9</sup>

El primer grupo comprende hierro, yodo, cobre, manganeso, zinc, cobalto, selenio y cromo cuya deficiencia de estos elementos en los animales y/o en el hombre está comprobada. No ocurre lo mismo con el molibdeno y el flúor, que pertenecen a una segunda categoría, pero que son elementos esenciales para algunos.<sup>6,7,8</sup>

La detección de carencias de algunos de ellos ha sido posible con el empleo de reacciones semi-sintéticas. A este grupo pertenecerían elementos como el boro o el bromo.<sup>9</sup>

A continuación se darán algunos aspectos relacionados entre los seres vivos y los elementos traza.

**Zinc:** Se trata de un mineral esencial para las plantas, los animales y los seres humanos. El zinc está asociado a una gran cantidad de procesos metabólicos importantes, por lo que es un nutriente indispensable para la salud humana y animal. La cisteína (aminoácido no esencial que utilizan las células para sintetizar proteínas) favorece la adsorción de este mineral, tras ello, y gracias a los jugos pancreáticos, es transportado a través de las células intestinales. Las mayores concentraciones de este mineral se encuentran en los huesos, músculos, piel y otros tejidos corporales. Es excretado vía urinaria y por las heces. Aunque es uno de los componentes más importantes de la dieta se ha demostrado que buena parte de la población padece carencias de este mineral. El zinc desempeña una serie de funciones, ayuda a la formación de insulina, está presente en la contractibilidad de los músculos, es esencial para la síntesis de proteínas, es importante para el equilibrio ácido-alcalino de la sangre, normaliza la función de la glándula prostática, es necesario para la síntesis de ADN, colabora en el desarrollo del esqueleto, sistema nervioso y cerebro del feto. La falta de zinc puede provocar, entre otros, baja tasa de crecimiento, alteraciones mentales, alteraciones en la forma y función de los órganos reproductores masculinos,

alteraciones en el sentido del gusto y del olfato, depresión inmunitaria, baja tolerancia a la glucosa. El zinc es poco tóxico, salvo cuando se ingiere en cantidades elevadas, superiores a 150 mg/kg. Los síntomas de intoxicación son náuseas, vómitos y fiebre.<sup>5</sup>

**Selenio:** Es un mineral esencial y de gran valor en nutrición humana. Es un elemento traza que actúa conjuntamente con la vitamina E, aumentando la inmunidad y produciendo enzimas que protegen al organismo de los peróxidos perjudiciales. Las personas con un bajo nivel de selenio en el organismo tienen una mayor probabilidad de contraer cáncer, trastornos cardíacos, enfermedades inflamatorias y cataratas, y de presentar signos de envejecimiento prematuros. Los bajos niveles de selenio en la sangre y en hígado son comunes en personas que sufren de enfermedades hepáticas crónicas. Una carencia mínima de Se puede alterar el estado de ánimo, causar estados de angustia y afectar niveles de energía.

En muchas regiones, se ha encontrado una relación estrecha entre deficiencia de selenio en los cultivos y en el suelo y la tasa de mortalidad por cáncer. El selenio ayuda a evitar el cáncer de esófago, estómago, colon y recto. Por otra parte, en la mujer, el selenio parece ejercer un poderoso efecto contra el cáncer de mama. No se conoce cuál es la ingesta diaria adecuada, aunque es probable que la gente que sigue una dieta balanceada cubra los requerimientos de este mineral. La toxicidad ocasionada por el selenio que contienen los alimentos es poco frecuente. Entre los síntomas ocasionados por exceso de selenio se incluyen depresión, nerviosismo, problemas emocionales, náuseas y vómitos. Las personas que habitan zonas industriales pueden presentar síntomas de toxicidad causados de selenio como trastornos hepáticos y miocardiopatía. Los niños que crecen en zonas ricas en Se tienen mayor predisposición a caries, piezas dentarias faltantes u obturadas. Las megadosis de Se son tóxicas, pudiendo causar caída del cabello, pérdida de las uñas, fatiga, náuseas, vómitos y aliento a leche agria.

El selenio se encuentra naturalmente en alimentos de origen animal, frutos de mar, carnes, hígado, riñón, vegetales y cereales integrales.

**Cobre:** Es un elemento esencial para los animales y humanos. Está asociado con las proteínas y enzimas. También es esencial para la reproducción. El Cu puede ser tóxico para animales. La toxicidad en el ganado y ovejas ocurre en concentraciones entre 25 y 100 mg/Kg peso seco. Se acumula en el hígado, cerebro y pelo. El cobre es tóxico para el hombre pero no venenoso. Dependiendo de la dieta y de la edad se concentra en el hígado. La enfermedad de Wilson es causada por la acumulación de cobre en el hígado y sistema nervioso central debido a la incapacidad del cuerpo para excretarlo. Los efectos agudos que pueden causar, incluyen úlceras gastrointestinales, necrosis hepática, daño renal. La deficiencia de cobre puede producir anemia asociada a problemas en la absorción de hierro, desequilibrios mentales o nerviosos, problemas en los huesos y sistema cardiovascular. Sin embargo, no es usual encontrar efectos tóxicos agudos por capacidad del hígado de reciclarlo. El cobre está presente en proteínas y enzimas de plantas y tienen un papel importante en la fotosíntesis y respiración celular. Así como también se encuentra en el hígado, riñón, mollejas y otras vísceras, en carnes, cereales integrales, frutas secas y legumbres.

La deficiencia de cobre puede producir crecimiento lento y problemas en la reproducción de las plantas. La deficiencia de cobre en la planta puede deberse a que el fosfato, Mn o Zn, compiten con el cobre disponible. Otros factores que afectarían la concentración de cobre en las plantas son la actividad microbiana, la humedad, el pH, el potencial redox y la especie de planta.<sup>3,6,12</sup>

**Cromo:** Es un elemento esencial para animales y el hombre. Los humanos son a menudo deficientes en este elemento como resultado de su bajo nivel en las plantas.

En forma orgánica, el cromo es un cofactor en la respuesta de la insulina al metabolismo de carbohidratos. Aparentemente el cromo no se acumula en ningún órgano, aunque se han encontrado casos de acumulación en el pulmón. La deficiencia de cromo afecta la intolerancia a la glucosa, eleva el colesterol y los triglicéridos; otras manifestaciones son: elevada concentración de insulina en la sangre, glicosuria, hiperglicemia, neuropatías y encefalopatías. La carne, queso, granos y cerveza constituyen buenas fuentes de cromo. Este elemento puede ser tóxico. Ciertas formas químicas como el Cr (III) pueden provocar efectos cancerígenos o mutagénicos y el Cr (VI) irritaciones cutáneas.<sup>7,12,13,14</sup>

Otros elementos traza, conocidos como no esenciales o tóxicos, pueden producir una patología aguda, desarrollada rápidamente tras la ingesta o el contacto con una dosis alta o crónica y por exposición a dosis bajas a largo plazo. Ejemplo de ellos son: Pb, Cd, Hg y As.<sup>13,14</sup>

**Plomo:** no es un elemento esencial para humanos, plantas y animales. Es tóxico para humanos, particularmente en los niños. Hay diversas fuentes de exposición que experimenta el hombre, las principales son el aire, agua, polvo, suelo y la dieta. El nivel de plomo aceptable en sangre es de 10 µg/dl. La toxicidad del plomo para muchos animales es alrededor de 30 mg Pb por Kg en la dieta. El plomo está presente en forma natural en la mayoría de los suelos. La principal forma de contaminación proviene del uso de la gasolina con agregado orgánico de plomo, práctica que ha disminuido en los últimos años a nivel mundial. Múltiples estudios han demostrado que este metal permanece principalmente en la superficie del suelo, lo que representa una ventaja, pues minimiza el riesgo de contaminación de aguas subterráneas. Sin embargo, al permanecer en la superficie aumenta el riesgo de exposición en niños. El plomo afecta al sistema nervioso y causa problemas en el crecimiento. La solubilidad del plomo en el

suelo depende de sus características químicas como pH, contenido de materia orgánica y capacidad de intercambio catiónico.<sup>4,11,15,16</sup>

**Mercurio:** es un elemento tóxico y no esencial para humanos, animales y plantas. El mercurio metilado es la forma más tóxica. El metilmercurio (MeHgOH) es un neurotóxico. Los peces y semillas contaminadas con mercurio han producido serios envenenamientos en humanos. Los compuestos de mercurio son neurotóxicos potentes que produce efectos en el organismo a nivel del sistema nervioso central de los fetos como también del neonato y niños, y a la misma dosis de exposición a Hg elemental, los niños son mucho más afectados que los adultos y puede inducir a rangos de discapacidad en el desarrollo neurológico de forma repentina y severa, dependiendo del nivel y duración de la exposición. Dado que no generan daños estructurales obvios, sus efectos no se detectan sino hasta que se diagnostica el desarrollo neurológico anormal de los niños. La exposición infantil a Hg es un problema que ha incrementado la atención entre las personas relacionadas con la salud. Los niños pueden presentar múltiples fuentes de exposición que van a afectar, como ya se mencionó, directamente su delicado desarrollo, estas posibilidades se incluyen desde el momento de la gestación si las madres se encuentran contaminadas por el mercurio, el cual puede alcanzarlos a través de la placenta y más tarde por la leche materna, pues el metilmercurio atraviesa la placenta y se deposita en el embrión, principalmente en el cerebro, aun en mayor concentración que en las madres.<sup>1,6, 17,18,19,20,21,22,23,24</sup>

Otras fuentes de exposición conocidas a medida que los niños se desarrollan son las amalgamas en los dientes, las vacunas que en su composición se encuentre el timerosal (una sal de mercurio) como preservante, los accidentes con termómetros de bulbo, y la ingesta de productos alimenticios con rastros de metal.<sup>25,26,27</sup>

**Cadmio:** es un elemento que está presente en suelos y rocas en forma natural, pero que también puede ser incorporado al ambiente a través de fertilizantes, plásticos, baterías, pilas, compuestos asociados con zinc, pinturas, aplicación de desechos al suelo y otros. Es uno de los contaminantes de suelos agrícolas de todo el mundo debido a su alta movilidad. El Cd no es un elemento esencial para los animales y el hombre, pero para ambos puede tener efectos tóxicos agudos de corto plazo y crónicos de mediano y largo plazo. Los últimos, por su capacidad de acumularse en órganos como riñón e hígado. Los efectos agudos pueden producir daños severos en varios órganos, entre ellos, edema pulmonar, problemas respiratorios, bronconeumonía. La acumulación de Cd en el cuerpo parece incrementar con la edad, disminuyendo después de los 50 años. Se ha estimado que la vida media del Cd en el riñón humano va de los 18 a 33 años. Otros efectos crónicos se relacionan con hipertensión, metabolismo de los carbohidratos, carcinogénesis, teratogénesis y daño testicular. La adsorción del Cd se debe a su unión con proteínas de bajo peso molecular, las thioninas, para formar melathionina que se acumula en la corteza del riñón. La máxima dosis diaria referencial en la dieta establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) para proteger la exposición humana a Cd es de 70 µg/g. A pesar de que no hay evidencia que la exposición humana a Cd por disposición de biosólidos aplicados al suelo haya producido efectos en la salud, hay evidencia de efectos adversos originados por el consume de alimentos contaminados con cadmio. El Zn, Fe, Cu Ca, ácido ascórbico y las proteínas pueden interactuar con el Cd. Una dieta baja en Fe contribuye con el aumento de retención de Cd; el aumento de Zn en la dieta induce la biosíntesis de metalothioninas, que se unen con el Cd y el Zn; deficiencia de calcio también aumentan la adsorción de Cd. De ahí, que el efecto potencial de Cd sobre los cultivos no solamente dependa de la concentración en ellos, sino que además de la biodisponibilidad y condiciones de nutrición humanas.<sup>28,29,30,31</sup>

Cada elemento traza puede tener unas características especiales de funcionamiento y de metabolismo y ser distinto su estado de oxidación, su afinidad para determinadas moléculas orgánicas y su capacidad de interacción, con otros elementos traza y con otros nutrientes.<sup>30,31,32</sup>

### **2.3.- Creatinina**

La creatinina es la manera más simple de monitorear la correcta función de los riñones, por lo cual se usó en este trabajo para expresar la concentración de Hg por gramos de creatinina en orina, así puede observar si la excreción del metal mediante la orina es por el mal funcionamiento de los riñones o por acumulación de este metal en el organismo.

La creatinina es un compuesto orgánico generado a partir de la degradación de la creatina (que es un nutriente útil para los músculos). Es un producto de desecho del metabolismo normal de los músculos que usualmente es producida por el cuerpo en una tasa muy constante (dependiendo de la masa de los músculos), y normalmente filtrada por los riñones y excretada en la orina. El fosfato de creatina es un compuesto que actúa como almacén de alta energía fácilmente convertible en ATP, en músculo y otros tejidos de mamíferos.

La creatina se sintetiza en hígado y páncreas. Desde estos órganos, a través del aparato circulatorio, se transporta hacia diferentes tejidos, donde puede fosforilarse. El contenido de creatina y fosfocreatina alcanza los 400 mg por 100g en el músculo, ambos componentes pueden convertirse espontáneamente en creatinina, que es eliminada por el riñón.

Puesto que la excreción de creatinina permanece relativamente constante para cada sujeto, mientras que el volumen de excreción urinario puede variar apreciablemente, se utiliza el nivel de creatinina en la orina diaria como índice al que referir los valores de otros metabolitos. Así, la concentración de aminoácidos en orina se suele expresar como cantidad de aminoácido por miligramo de creatinina.

La creatinina se utiliza para evaluar la función de los riñones, de las diferentes hormonas que lo regulan, y situaciones de la regulación de líquidos en el cuerpo humano. El análisis de orina se realiza como estudio rutinario para discriminación del estado de salud, para el diagnóstico precoz de diferentes enfermedades, para el control de la diabetes o enfermedades renales. También para diagnosticar infecciones urinarias o la presencia de enfermedades renales.

Diariamente se excretan, en hombres, 1-2 g de creatinina en la orina. En mujeres, la excreción es algo menor, oscilando entre 0.8 y 1.8 g. Por tanto, la concentración de este compuesto en la orina depende del volumen de diuresis. Las determinaciones de creatinina en orina y en plasma se utilizan para calcular el *aclaramiento de creatinina*, prueba utilizada para estimar el filtrado glomerular y, por tanto, para valorar la función renal.

Aunque se han descrito otros procedimientos más específicos para determinar creatinina en plasma u orina, el método más rápido es el basado en la reacción de Jaffé, es decir, la formación de un complejo con coloración amarillo-naranja por reacción con el picrato en medio alcalino.

## **2.4.- Tratamientos para el autismo**

### **2.4.1.- Quelación en autismo**

La quelación es un tratamiento que se está llevando a cabo para la desintoxicación con metales pesados en niños con Síndrome de Espectro Autistas, así como también personas que están contaminadas con metales tóxicos como son los odontólogos.

Hoy en día, tenemos en nuestros cuerpos entre 400 y 700 veces más cantidad de metales pesados, que la generación que vivió hace 100 años.

En nuestro organismo estos metales se acumulan en las grasas y los huesos y no pueden eliminarse por lo que su efecto es permanente y acumulativo. Son altamente reactivos y roban electrones a diferentes estructuras celulares generando radicales libres de forma continua, que a su vez, dañan otras moléculas o estructuras para restituir los suyos propios. Este proceso entra entonces en un círculo vicioso produciendo daños en toda sustancia o estructura celular.

Toda enfermedad crónica tiene relación con este fenómeno, especialmente las que constituyen las causas de muerte más frecuentes como son los infartos de corazón, los derrames cerebrales, el cáncer y los problemas reumáticos. El daño oxidativo del endotelio vascular, el ADN de las células y el cartílago articular ha sido severamente agravado por la acumulación de estos tóxicos.

La quelación consiste en la administración de una sustancia específica, ya sea por vía oral o intravenosa de agentes quelantes como el Acido Etileno Diamino Tetracético (EDTA), el Acido 2-3 Dimercapto Succínico (DMSA) o el Acido Lipóico (LA), que de manera muy parecida a lo que hace un imán, atrae y fija a ella los metales pesados y tóxicos que han impregnado el cerebro y hay depositados en otros tejidos causando una gran variedad de síntomas y enfermedades. Se usa principalmente para el tratamiento de diferentes enfermedades que tienen como causa principal la acumulación de calcio en las paredes arteriales o las intoxicaciones por diversos metales pesados, como el plomo o el mercurio.

Esta sustancia con su tóxica y dañina carga atrapada y ligada a ella, rápidamente es excretada o eliminada del organismo, la mayoría de las veces a través de la orina, llevando consigo una pequeñísima cantidad del tóxico. El proceso debe repetirse las veces que sea necesario hasta que han desaparecido los síntomas del paciente o no hay muestras de que el tóxico sigue eliminándose en la orina.

Los niños con altos contenidos de metales tóxicos en su cuerpo como los son el Hg y el Pb son reducidos mediante este método, sin embargo es bueno hacer primero la dieta libre de gluten y caseína para ver si es necesario quelar a los niños autistas.

#### **2.4.2.- Dieta libre de gluten y caseína**

La dieta libre de gluten y caseína es otro tratamiento que se lleva a cabo, preferiblemente antes de la quelación, esta dieta es necesaria ya que los niños con Síndrome de Espectro Autista poseen un sistema gastrointestinal muy sensible e inmaduro, y tanto el gluten como la caseína les hacen daño al intestino delgado y le

provocan a éstos niños características comportamentales más acentuadas como puede ser, más hiperactividad de lo normal, agresividad, entre otros.

El gluten es el nombre general que se le da a las proteínas presentes en los granos, como el trigo, la cebada, el centeno y la avena. Una dieta sin gluten elimina alimentos e ingredientes que contienen estos granos. Su médico puede recetarle una dieta sin gluten si se le diagnosticó enfermedad celíaca u otras formas de intolerancia al gluten.

En general, esta dieta se necesita permanentemente y *no se debe suspender* a menos que su médico así se lo indique.

Debido a que incluso cantidades pequeñas de gluten pueden causar daño en el intestino delgado y con frecuencia síntomas, como diarrea, vómitos, pérdida de peso, anemia y fatiga, es fundamental seguir la dieta exactamente según lo indicado. En algunos casos, las personas pueden tener reacciones más graves. Las carnes, frutas y verduras frescas, y los productos lácteos no contienen gluten naturalmente.

Entre los alimentos e ingredientes no se permiten en la dieta sin gluten están: Cebada, malta, extracto de malta, mezcla de cereales avena, salvado de avena, almidón vegetal, cuscús centeno trigo, fibra, germen de trigo, trigo duro semolina, fécula de maíz, entre otros.

Entre los alimentos e ingredientes se permiten en la dieta sin gluten están: amaranto, papas, arroz, harina de frijol, alforfón, maíz, sorgo, tapioca, harina de frutos secos, entre otros.

### 3.- Estudios realizados sobre la incidencia de los elementos traza y su relación con el autismo

---

- Adams, J., et. al. (2003), determinaron los niveles de 39 metales tóxicos y minerales esenciales en muestras de cabello para niños con trastornos del espectro autista y un subconjunto de sus madres en comparación con los controles. Observándose que: (1) los niveles de yodo son un 45% menor en los niños con autismo ( $p = 0,005$ ); (2) los niveles de litio fueron 30% más bajos ( $p = 0,04$ ) en los niños más pequeños con autismo. Además, las madres de niños pequeños con autismo tenían niveles especialmente bajos de litio (-56%,  $P = 0,005$ ). (3) Los niños con pica tenía un 38% menos en el nivel de cromo ( $p = 0,002$ ), y también más bajos niveles (58% menos) de sodio ( $p = 0,05$ ). (4) Los niños con bajo tono muscular presentaron niveles muy bajos de potasio (-66%,  $p = 0,01$ ), altos de zinc (+31%,  $p = 0,01$ ), y elevados niveles de bario (+109%,  $p = 0,03$ ). Concluyéndose así que todos los resultados antes mencionados deben ser investigados en un estudio más amplio, para confirmar los hallazgos. Estos hallazgos pueden ser importantes en términos de que apunta a las deficiencias nutricionales como un factor que contribuye a la etiología del autismo.<sup>33</sup>

- Holmes, A., et. al. (2003), estudiaron los niveles de mercurio en el primer corte de cabello de niños autistas (de bebés). Trabajaron con muestras de 94 niños diagnosticados con autismo utilizando el Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales, 4<sup>a</sup> edición (DSM IV). Asimismo, recolectaron información, a través de cuestionarios maternos y observación clínica, respecto a la dieta, número de amalgamas dentales, historia de vacunas, la administración de inmunoglobulina Rho D, el autismo y la gravedad de los síntomas; logrando hallar que los niveles de mercurio en el grupo autista fue de 0,47 ppm frente a 3,63 ppm en los controles, una diferencia significativa. Además, encontraron que en las madres del grupo de autistas habían niveles más altos de exposición al mercurio a través de inyecciones de inmunoglobulina

Rho D y del número de amalgamas dentales que en las madres del grupo control. Además, en el grupo de niños autistas, los niveles de mercurio en el cabello variaron considerablemente en función de la severidad del autismo, obteniendo medias de 0,79, 0.46 y 0.21 ppm para moderado, severo y leve, respectivamente. También hallaron que, los niveles de mercurio en el cabello entre los controles, se correlacionó significativamente con el número de amalgamas y el consumo de pescado de las madres, así como la exposición al mercurio a través de vacunas de la niñez, correlaciones que estuvieron ausentes en el grupo de autistas. Adicionalmente, los patrones de excreción de mercurio en el cabello de los niños autistas se redujo significativamente en relación con la población control. En consecuencia, llegaron a la conclusión de que los datos que obtuvieron ponen en duda la eficacia de los análisis de cabello como una medida del total de la exposición al mercurio en un subconjunto de la población y, que a la luz de la verosimilitud biológica del mercurio en el papel de los trastornos neurológicos del desarrollo, es posible que exista un mecanismo por el cual la exposición al mercurio pueda aumentar el riesgo de autismo.<sup>34</sup>

- Adams, J., et. al (2006), desarrollaron un estudio que compara la excreción de mercurio después de un período de tres días de tratamiento con un agente quelante oral, ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), en niños con trastornos del espectro autista y de una población control. En general, las concentraciones de mercurio en orina fueron significativamente mayores en 221 niños con trastornos del espectro autista que en 18 controles normales (aumento relativo (RI) = 3,15, P <0,0002). Además, en los casos de niños vacunados, se notó una concentración de mercurio urinario significativamente mayor que la de los controles sin vacunar (RI = 5,94, P <0,005). Sin embargo, las concentraciones de mercurio urinario observado entre controles vacunados y sin vacunar fueron similares, y no se encontró asociación entre el cadmio en orina o las concentraciones de plomo y el trastorno del espectro autista. Concluyéndose así, que las concentraciones de mercurio determinadas en la orina,

podrían plausiblemente ser una consecuencia del contenido de timerosal de las vacunas infantiles, aunque fuentes externas de mercurio, incluyendo la exposición de las madres al metal, también pueden contribuir en la carga metálica encontrada. Por lo tanto, independientemente del mecanismo por el cual los niños con trastornos del espectro autista logren expulsar concentraciones elevadas de mercurio por la orina, el tratamiento DMSA descrito en este estudio podría ser útil para diagnosticar la carga de mercurio en niños de espectro autista.<sup>35</sup>

- Palmer, R. (2006), estudió los datos de liberación de mercurio de 39 centrales eléctricas encendidas por carbón y 56 estaciones industriales de Texas y se examinaron los índices de autismo de 1.040 distritos de este Estado. Por cada 1.000 libras de mercurio liberado en el ambiente por las fuentes industriales de Texas en 1998, había un aumento del 2,6% en el índice de autismo para el año 2000 y éste ascendía al 3,7% por cada 1.000 libras de mercurio liberado por las centrales eléctricas. Palmer logró determinar que la prevalencia de autismo se reducía del uno al dos por ciento por cada 10 millas de distancia de la fuente de mercurio y, concluyendo así que los niveles de mercurio en plantas, animales y personas son más altos cuando están cerca de una fuente de liberación de este metal. Esto puede ser más peligroso si los afectados son niños, sobretodo en la fase de desarrollo de los nervios, lo que puede llevar a trastornos como el autismo.<sup>36</sup>

- Lathe, R. (2006), realizó el análisis de muestras de orina de cientos de niños franceses, con y sin autismo, con la finalidad de establecer relaciones entre el autismo y la exposición a metales pesados. Logrando observar que las muestras de los niños con autismo contenían niveles extraordinariamente elevados de una familia de proteínas conocidas como porfirinas (las concentraciones de la molécula coproporfirina en la orina de los niños con autismo eran 2,6 veces las de los niños de control). Las porfirinas son precursoras en la producción de hemo, el componente de la hemoglobina

que transporta el oxígeno, y los metales pesados bloquean la producción de hemo, haciendo que las porfirinas se acumulen en la orina. Lathe, concluyó que si la tendencia observada lograra confirmarse, significaría que algunos casos de autismo se podrían tratar con fármacos que eliminen los metales pesados del cuerpo.<sup>37</sup>

## **4.- Técnicas analíticas empleadas para la determinación de elementos traza en cabello y orina de niños con síndrome espectro autista**

---

Las técnicas analíticas comúnmente empleadas para la determinación de elementos en muestras clínicas son las de espectrometría atómica, las cuales están basadas en la utilización átomos al estado de vapor activados mediante energía electromagnética o energía térmica, midiendo la energía absorbida o emitida por los átomos al pasar a un estado activado o al volver del estado activado.

Las técnicas Atómicas pueden ser: Espectroscópicas (Absorción, fluorescencia y emisión atómica) y Espectroscopía de Masas. Todas las técnicas Atómicas tienen en común su gran sensibilidad y selectividad, al estar basadas en transiciones electrónicas de átomos que se producen de forma definida para cada átomo y siendo distinta de un átomo a otro. Esta característica posibilita la determinación multielemental en una sola medida y prácticamente sin interferencias. En este trabajo, se utilizará la espectroscopía de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES), espectrofotometría de absorción atómica con generación de vapor frío (CV-AAS) y espectrometría ultravioleta-visible. Se darán detalles de las mismas.

### **4.1.- Espectroscopía de Emisión Atómica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP, Inductively Coupled Plasma)**

Un plasma es una mezcla gaseosa conductora de electricidad que contiene una concentración significativa de cationes y electrones, donde la concentración de ambos es tal que la carga neta se aproxima a cero, alcanzándose temperaturas que pueden llegar a los 10000 K. Un plasma característico tiene un núcleo blanco brillante,

coronado por una cola en forma de llama. Este núcleo consiste en una emisión continua a la que se superpone el espectro atómico del argón, por lo que las observaciones espectrales se hacen generalmente a una altura de 15 a 20 mm por encima de la bobina de inducción, garantizando así que la radiación de fondo esté libre de las líneas de argón. En la figura 4 se muestra una fuente de plasma de acoplamiento inductivo típica llamada antorcha.<sup>38</sup>

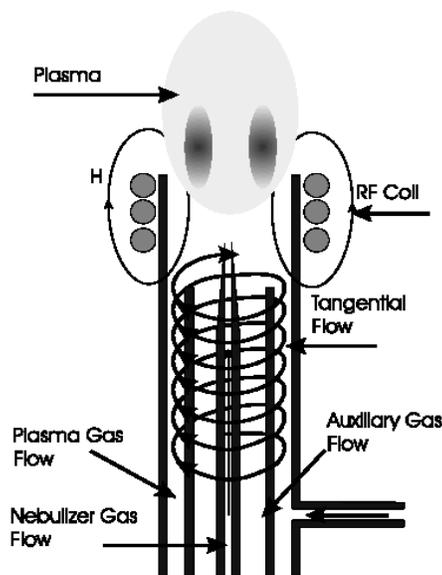
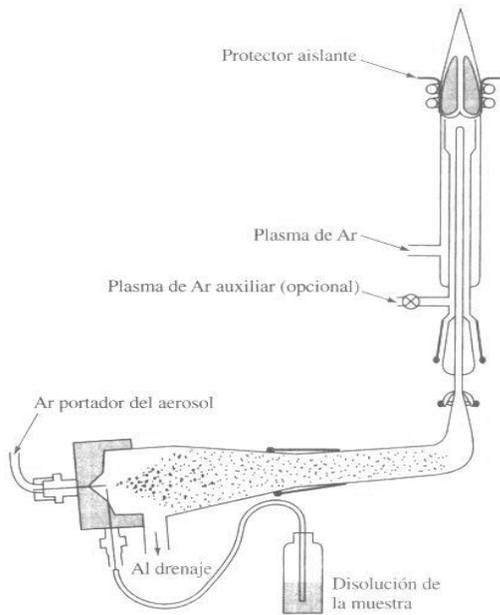


Figura 4. Fuente de plasma acoplado inductivamente

Esta antorcha consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluyen corrientes de argón. La velocidad de consumo de argón depende del diseño de la antorcha, variando de 5 a 20 L/min. El diámetro del tubo más grande es de aproximadamente 2,5 cm, y en la parte superior de este se encuentra una bobina de inducción (refrigerada por agua) que está alimentada por un generador de radiofrecuencia. La ionización del argón se inicia con una chispa que proviene de la bobina, y los iones resultantes (con sus electrones asociados) interactúan con el campo magnético oscilante producido por la bobina de inducción. Finalmente el calentamiento se debe a la resistencia que presentan los iones y electrones al movimiento circular que estos sufren dentro de la bobina.<sup>38</sup>

Las muestras se introducen en la antorcha por medio de un flujo de argón a través del tubo central de cuarzo. Los dispositivos más comunes para la inyección de la muestra son los nebulizadores, donde una disposición típica de nebulizador para la inyección de la muestra en una fuente de plasma es mostrada en la figura 5 a continuación.



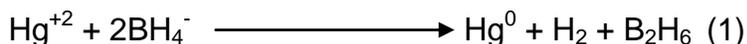
**Figura 5.** Nebulizador para la inyección de la muestra en una

fuelle de plasma.

En esta disposición, la muestra se nebuliza mediante un nebulizador de flujo cruzado con una corriente de argón, donde las gotas más finamente divididas se introducen en el plasma. También se utilizado nebulizadores ultrasónicos y la vaporización electrotérmica.<sup>38</sup>

## 4.2.- Espectrofotometría De Absorción Atómica Con Generación De Vapor Frío (CV-AAS)

La técnica de vapor frío es un método de atomización aplicable solamente a la determinación de Hg, ya que es el único elemento metálico que tiene una presión de vapor apreciable a temperatura ambiente. El método de elección para su análisis es la vaporización fría seguida de espectrofotometría de absorción atómica. En la realización de este tipo de análisis el Hg se convierte en  $\text{Hg}^{+2}$  por tratamiento de las muestras con una mezcla oxidante de ácidos nítrico y sulfúrico, seguido de la reducción del  $\text{Hg}^{+2}$  al metal ( $\text{Hg}^0$ ), normalmente volátil, con un  $\text{NaBH}_4$ , en un sistema cerrado, produciéndose así la reacción descrita por la siguiente ecuación química:



El mercurio elemental es conducido mediante un gas a una célula de cuarzo (tubo de absorción de camino óptico largo) por donde pasa el rayo de luz monocromática correspondiente (longitud de onda de 253,7 nm). Se obtienen los límites de detección en un intervalo de las partes por billón.

## 4.3.- Espectrometría Ultravioleta-Visible

La espectrometría ultravioleta-visible o espectrofotometría UV-Vis implica la espectroscopia de fotones en la región de radiación ultravioleta-visible. Utiliza la luz en los rangos visible y adyacentes (el ultravioleta (UV) cercano y el infrarrojo (IR) cercano). En esta región del espectro electromagnético, las moléculas se someten a transiciones electrónicas.<sup>38</sup>

Esta técnica es complementaria de la espectrometría de fluorescencia, que trata con transiciones desde el estado excitado al estado basal, mientras que la espectrometría de absorción mide transiciones desde el estado basal al estado excitado.

#### **4.3.1.- Aplicaciones**

La espectrometría UV/Vis se utiliza habitualmente en la determinación cuantitativa de soluciones de iones metálicos de transición y compuestos orgánicos muy conjugados.

Soluciones de iones metálicos de transición: pueden ser coloreadas (es decir, absorben la luz visible) debido a que los electrones en los átomos de metal se pueden excitar desde un estado electrónico a otro. El color de las soluciones de iones metálicos se ve muy afectado por la presencia de otras especies, como algunos aniones o ligandos.

Compuestos orgánicos: absorben luz en las regiones del espectro electromagnético visible o ultravioleta. Los disolventes para estas determinaciones son a menudo el agua para los compuestos solubles en agua, o el etanol para compuestos orgánicos solubles. Los disolventes orgánicos pueden tener una significativa absorción de UV, por lo que no todos los disolventes son adecuados para su uso en espectrometría UV. El etanol absorbe muy débilmente en la mayoría de longitudes de onda. La polaridad y el pH del disolvente pueden afectar la absorción del espectro de un compuesto orgánico.

La **ley de Beer-Lambert** establece que la absorbancia de una solución es directamente proporcional a la concentración de la solución. Por tanto, la espectrometría UV/VIS puede usarse para determinar la concentración de una solución. Es necesario saber con qué rapidez cambia la absorbancia con la concentración. Esto puede ser obtenido a partir de referencias (las tablas de coeficientes de extinción molar) o, con más exactitud, determinándolo a partir de una curva de calibración.

La ley de Beer-Lambert se expresa así:  $A = -\log_{10}(I/I_0) = \epsilon \cdot c \cdot L$

donde A es la absorbancia medida, I<sub>0</sub> es la intensidad de la luz incidente a una determinada longitud de onda, I es la intensidad de transmisión, L la longitud de ruta a través de la muestra, y c la concentración de las especies absorbentes. Para cada especie y longitud de onda, ε es una constante conocida como absortividad molar o coeficiente de extinción. Esta constante es una propiedad fundamental molecular en un solvente dado, a una temperatura y presión particular, y tiene como unidades 1/M \* cm o, a menudo, U/M \* cm.

## 5.- Justificación y Objetivos

---

Como se desprende de la introducción de este trabajo, elementos tales como Zn, Cu, Cr, Se, Hg, Pb y Cd, tienen un efecto sobre los síntomas del autismo, entre ellos: aislamientos, pobre interacción social, comportamiento extremo de hiperactividad o hipoactividad, entre otros. Es por ello que se justifican todos los estudios que permitan evaluar el papel que juegan los elementos traza en el Síndrome Espectro Autista. En este sentido, el trabajo se propone como objetivo principal: la determinación del contenido de elementos traza Zn, Cu, Cr, Se, Pb, Cd y Hg en muestras biológicas de niños venezolanos con síndrome de espectro autista empleando técnicas espectroscópicas. Vale la pena destacar que este trabajo es parte de un proyecto del Centro de Química Analítica.

Para alcanzar el objetivo principal, se proponen los siguientes objetivos parciales:

- ◆ Determinar las concentraciones de los metales esenciales: Zn, Cu, Cr, Se y no esenciales: Hg, Pb, Cd, en cabello y orina de niños con síndrome espectro autista, a través de técnicas espectroscópicas.
- ◆ Comparar el contenido de los elementos traza en niños autistas con el de un grupo control en cabello y en orina.
- ◆ Comparar las concentraciones de los elementos en estudio de cabello con respecto a la orina.
- ◆ Estudiar la existencia de posibles relaciones entre los elementos traza en niños con síndrome de espectro autista y niños sanos.

## 6.- Parte Experimental

### 6.1.- Instrumentación

#### 6.1.1.- Plasma Óptico Inductivamente Acoplado (ICP-OES)

Se utilizó un Espectrómetro de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado, ICP-OES, marca Thermo Jarrel Ash, modelo IRIS-HR, como el que se observa en la figura 6.



**Figura 6.** Espectrómetro de ICP-OES

Está constituido por un generador de radiofrecuencia de 220 V que opera a una frecuencia de 27,12 MHz, un quemador del tipo desmontable de cuarzo con un inyector

de 1,00 mm de diámetro, circundado por tres espiras de cobre de 4,00 mm de diámetro externo, refrigeradas mediante agua.

El sistema óptico está constituido por un monocromador de dispersión cruzada, provisto de una red de "Echelle", de 62 líneas/mm con una distancia focal de 381 mm y un prisma para separar los distintos ordenes. Este arreglo permite obtener un espectro en dos dimensiones.

El detector es de tipo de estado sólido (fabricado de Si), donde la cantidad de fotones que llega a éste es proporcional a la corriente eléctrica generada. El tipo de detector del equipo es un CID (Detector de Inyección a la carga) el cual opera a bajas temperaturas (-70 °C), mediante la ayuda del argón que circula en una unidad refrigerante. Con éste detector es posible realizar análisis simultáneos.

La tabla 1 presenta las condiciones de trabajo empleadas las cuales fueron optimizadas en los trabajos previos.<sup>39</sup>

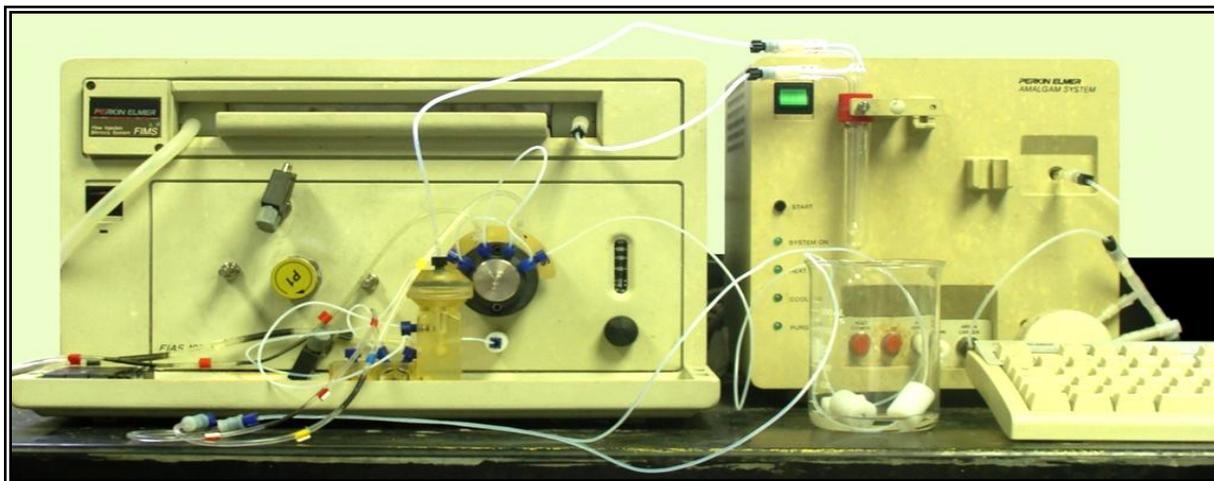
**Tabla 1.-** Condiciones de operación del equipo ICP-OES y longitudes de onda de trabajo.

Parámetros de operación	Valor
Potencia del generador RF	1350 W
Flujo gas plasmógeno	12 L/min
Flujo de gas nebulizador	22 psi
Aspiración de muestra	1,14 mL/min
Flujo de gas auxiliar	1,5 L/min
$\lambda_{\text{trabajo}}$ (nm)	Zn(II):202,5; Cu(I):219,9; Cr(II):283,5; Se(I):196,0; Pb(II):220,3; Cd(I):226,5;

### 6.1.2.- Espectrofotómetro de Absorción Atómica con Generación de Vapor Frío (CV-AAS)

Para la determinación del contenido de mercurio en las muestras, se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica con generación de vapor frío (CV-AAS), marca Perkin Elmer, modelo FIMS – 100 Flow Injection (ver figura 7), que consta de una válvula de 4 puertos y un separador gas líquido. Este equipo tiene una sensibilidad característica de  $0,25 \text{ ng}$ , la radiación es obtenida por una lámpara de mercurio Perkin Elmer, junto con una celda de cuarzo del tipo FIMS-cell.

**Figura 7.** Espectrómetro de absorción atómica con generación de vapor frío, marca Perkin Elmer, modelo FIMS-100.



En la tabla 2 se presentan las condiciones óptimas seleccionadas para la determinación de Hg en las muestras.

**Tabla 2.-** Condiciones de operación del equipo para la determinación de Hg en las muestras.

Parámetros de operación	Valor
Longitud de onda ( $\lambda$ )	253,7 nm
[NaBH <sub>4</sub> ] <sub>concentración</sub>	0,2% m/v
[HCl] <sub>concentración</sub>	5% p/v
Flujo de reductor	5 mL/min
Flujo de ácido transportador (HCl)	9 mL/min

### 6.1.3.- Espectrómetro Uv-Visible

El instrumento utilizado en la espectrometría ultravioleta-visible se denomina espectrofotómetro UV-Vis. Mide la intensidad de luz que pasa a través de una muestra (I), y la compara con la intensidad de luz antes de pasar a través de la muestra (I<sub>0</sub>). La relación  $I / I_0$  denominada transmitancia, y se expresa habitualmente como un porcentaje (%T). La absorbancia (A) se basa en la transmisión:

$$A = 2 - \log (\%T)$$

Las muestras para espectrofotometría UV-Vis suelen ser líquidas. Estas muestras suelen ser colocadas en una célula transparente, conocida como cubeta. Las cubetas suelen ser rectangulares, con una anchura interior de 1 cm. Esta anchura se convierte en la longitud de onda, L, en la Ley de Beer-Lambert. También se pueden usar tubos de ensayo como cubetas en algunos instrumentos. Las mejores cubetas están hechas con cuarzo de alta calidad, aunque son comunes las de vidrio o plástico. El cristal y la mayoría de los plásticos absorben en el UV, lo que limita su utilidad para longitudes de onda visibles.

La figura 8 presenta el espectrofotómetro uv- visible que se usó para la determinación de creatinina en las muestras de orina, en el cual se trabajó a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 210 nm.



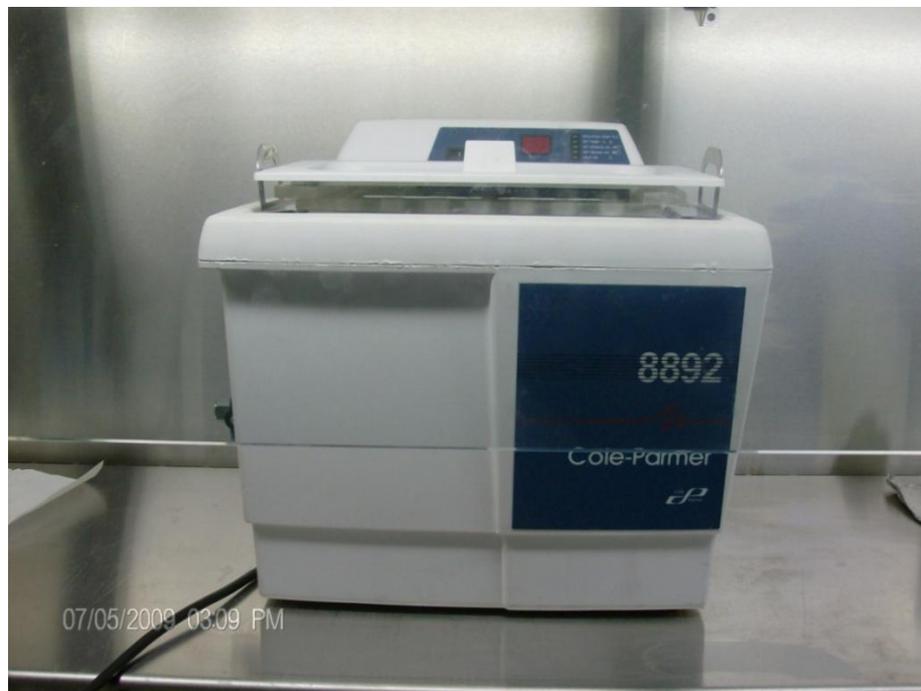
Figura 8. Espectrofotómetro UV- Visible

#### 6.1.4.- Extracción con Sonda de Ultrasonido (UPS, Ultrasound Probe Sonication)

Este método es comúnmente utilizado para remover partículas de un sustrato o para acelerar los procesos de mezclado. El uso de baños ultrasónicos estándar operando a 40 KHz es muy fácil de implementar y tienen una alta eficiencia. Aquí se induce la cavitación acústica, provocada por la formación de burbujas a partir de ondas sónicas en un líquido continuamente comprimido y descomprimido. Como resultado se obtienen temperaturas y presiones extremas generadas en el líquido, y como consecuencia, cuando un sólido está presente en el solvente, los compuestos

presentes en el sólido pueden ser extraídos parcial o completamente dentro del medio líquido con mayor rapidez que en otros métodos clásicos.

Se empleó un baño de ultrasonido de la casa Cole Palmer, modelo 8894 con porta muestra circular semigiratorio, el cual se muestra en la figura 10, para agilizar el proceso de digestión de la muestra.



**Figura 9.** Equipo para baño de ultrasonido

## 6.2.- Reactivos y materiales a usar

### 6.2.1.- Digestión De Cabello

- Acetona al 99,5 % (marca Riedel de Haen)
- $\text{HNO}_3$  al 65 % p/p tetradestilado (marca Riedel de Haen)
- Destilador de teflón (para destilar el  $\text{HNO}_3$ )
- $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30% p/p (marca Riedel de Haen)
- Sal di-sódica de EDTA al 99% de pureza (marca Merck)

### 6.2.2.- Preparación De Patrones Multielementales

- Estándares de Zn, Cu, Cr, Se, Pb y Cd de 1000 mg/L al 2 % de  $\text{HNO}_3$  (marca Merck)
- Estándar de Hg de 1000 mg/L al 2 % de  $\text{HNO}_3$  (marca High-purity Standard)
- $\text{HNO}_3$  tetradestilado al 65% p/p (marca Riedel-de-Haën)
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98% p/p (marca Riedel-de-Haën)

### 6.2.3.- Digestión De Orina

- $\text{HNO}_3$  al 65% p/p tetradestilado (marca Riedel-de-Haën)
- $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 98% p/p (marca Riedel-de-Haën)
- $\text{KMnO}_4$  al 99,1% p/p (marca J.T. Baker)
- $\text{NaBH}_4$  al 95% p/p, como agente reductor (marca Riedel-de-Haën)
- $\text{HCl}$  al 99% p/p, como ácido transportador (marca Merck)
- Agua 18 M $\Omega$ , obtenida de un sistema Nano pure (Barnstead Thermolyne, Alemania)

#### **6.2.4.- Determinación de Creatinina**

- Ácido pícrico (solución saturada)
- NaOH al 10 %.
- Solución madre de creatinina ( $C_4H_7N_3O$ ) (pesar 0,5 g. de creatinina pura y seca), colocar en un balón de 500 mL, disolver con HCl al 0,1 N y completar hasta la marca, la solución tiene una concentración de 1mL equivalente a 1 mg.

### **6.3.- Metodología Experimental**

#### **6.3.1.- Análisis de muestras de orina de niños con síndrome espectro autista**

##### **6.3.1.1.- Recolección de Muestras**

Para la recolección de muestras, se les facilitó a los representantes de los niños un folleto informativo mostrado en el apéndice 8 así como también otro folleto instructivo presentado en el apéndice 9 de cómo recoger las muestras.

La recolección de orina, se realizó de la siguiente forma, primero se le suministró a los representantes de los niños una botella de vidrio color ámbar de un volumen de un litro aproximadamente en el cual se colocaría la orina, esta muestra debe tener una duración de 24 horas, es decir, se recolectó durante todo el día, descartando la primera micción y recolectando a partir de la segunda y así todas las siguientes hasta la primera micción del día siguiente, incluyéndola. Esta botella siempre se mantuvo refrigerada para evitar la descomposición de la misma, tras cada micción del infante se introdujo en la nevera. Una vez finalizado el proceso de recolección de la muestra, se mantuvo la misma refrigerada hasta el momento de su entrega al analista. Finalmente se identificaron los recipientes todos los datos del niño. Adicionalmente se les

proporcionó una encuesta a los representantes para que la llenaran y así tener datos de los padres y a su vez del niño en cuestión, mostrada en el apéndice 10.

### **6.3.2.2.- Tratamiento de muestras de orina 24 horas para ser determinadas mediante ICP y CV-AAS**

Las muestras de orina fueron digeridas según la metodología optimizada por Carrión, Caetano, Guillén y Hernández, para la determinación de Hg.

En la figura 10 se presenta un esquema del procedimiento experimental de trabajo para la digestión de orina. Primero, se pesaron 15 g. de orina en tubos de vidrio limpios, secos y rotulados, éstos tubos se colocaron en un baño de hielo y se le adicionaron 4 mL de una mezcla ácida  $\text{HNO}_3$  (tetradestilado):  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2:1), se taparon los tubos y se sometieron a un baño de ultrasonido durante 60 minutos a una temperatura de 55 °C. Posteriormente se destaparon los tubos y se les añadió 1 mL de  $\text{KMnO}_4$  al 5 % p/v a cada uno, se taparon y se sometieron de nuevo a ultrasonido por 20 minutos a una temperatura de 55 °C. Finalmente se agregó  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30 % p/p gota a gota hasta que se decoloró la solución de  $\text{KMnO}_4$  y se analizó mediante técnicas respectivas.

Cabe acotar que las muestras se mantuvieron bajo refrigeración hasta el momento de su análisis. Se determinó el Hg empleando la espectrometría de absorción atómica con generación de vapor frío y el resto de los elementos (Cr, Pb, Cd, Cu y Zn) por espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado.

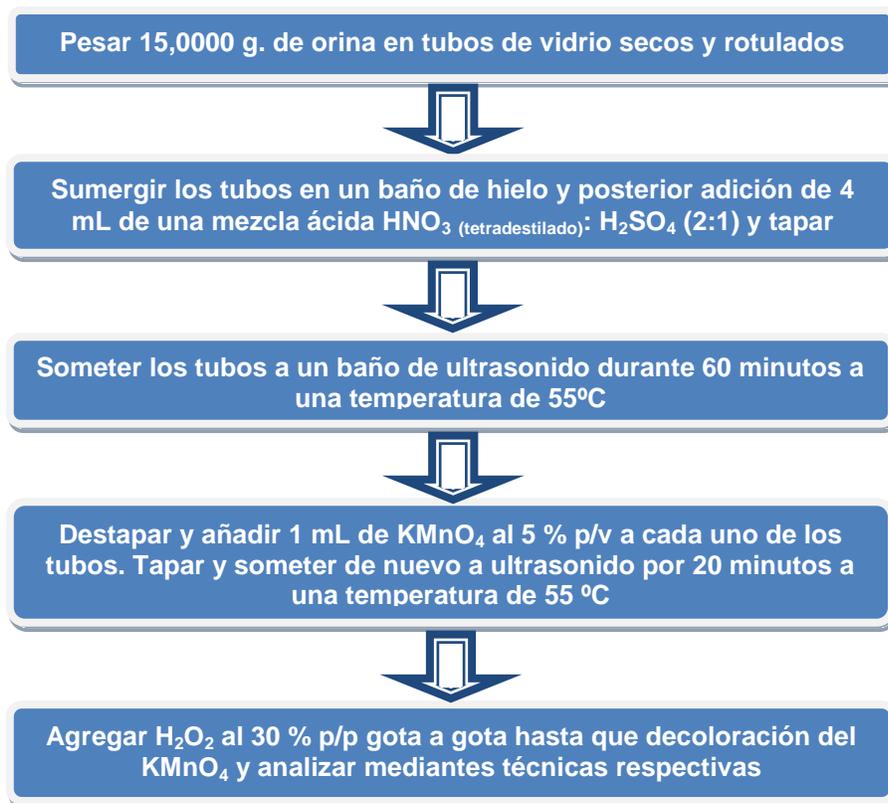


Figura 10. Esquema de procedimiento experimental para la digestión de orina 24 horas

### 6.3.2.- Análisis de muestras de cabello de niños con síndrome espectro autista

#### 6.3.2.1.- Recolección de Muestras

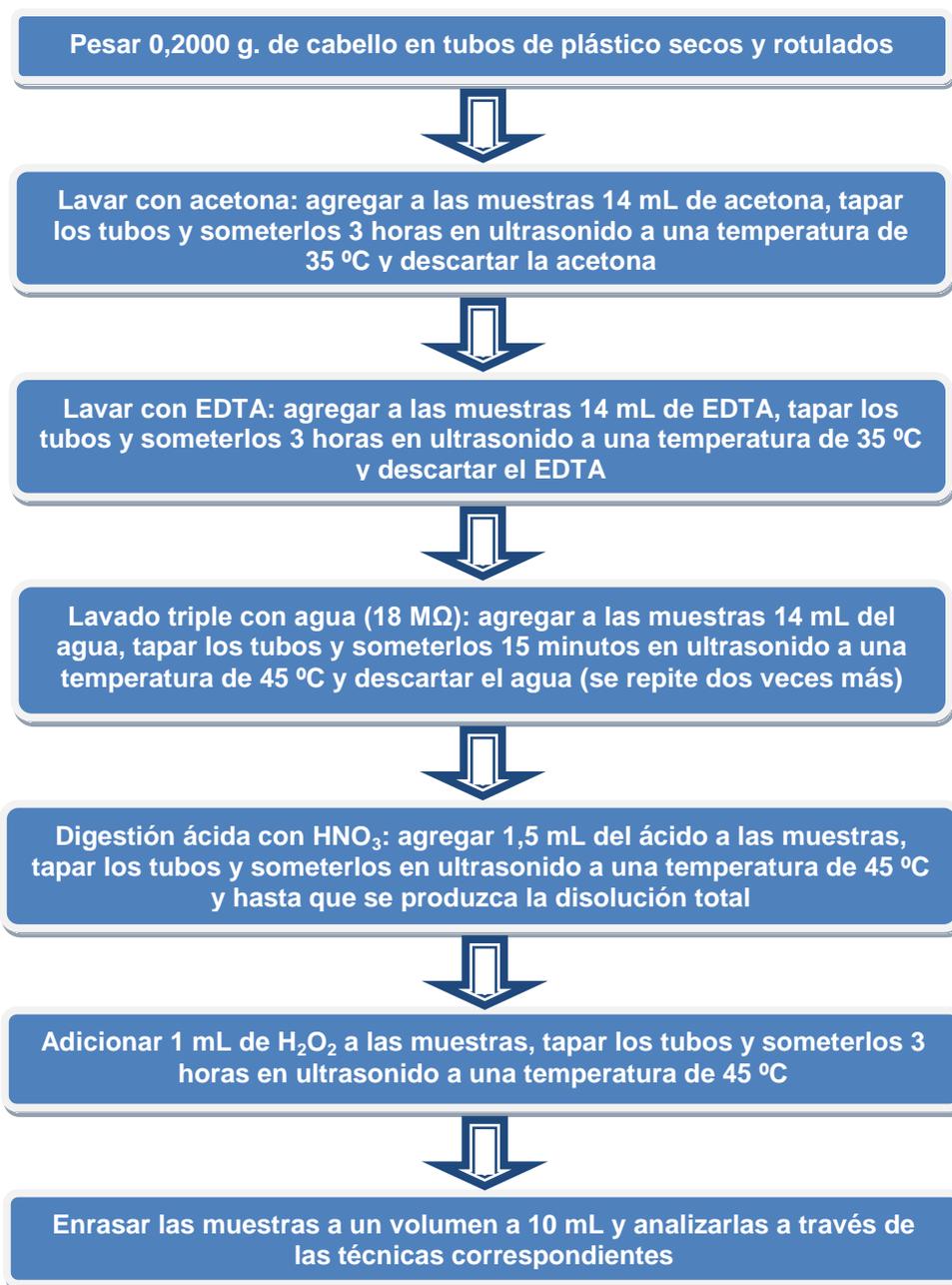
Antes de proceder a la toma de muestra, se limpió la tijera con la que se cortó el cabello con acetona para eliminar todo vestigio de grasa y polvo que pudiera quedar en sus superficies de corte. De igual forma, la persona que tomó la muestra se lavó bien las manos antes de proceder a la colección o usar guantes adecuados. Se evitó la utilización de talco en la preservación de éstos. Se utilizaron tijeras de acero inoxidable o de plástico.

Para la recolección de las muestras, se recortó aproximadamente 100 gr de cabello de la región occipital de la cabeza del infante. El corte se realizó lo más cercano posible al cuero cabelludo.

### **6.3.2.2.- Tratamiento de muestras de cabello para ser determinadas mediante ICP y CV-AAS**

Las muestras de cabello fueron tratadas partiendo de la metodología optimizada por Pérez y Rojas, para la determinación de Pb, Cr, Cu, Se y Zn.<sup>39, 40</sup>

Para la digestión de las muestras de cabello se sigue el esquema que está presentado en la figura 11. Se pesaron 0,2000 g. de cabello en tubos de plástico secos y rotulados, luego se realizó un lavado con acetona, éste se hizo agregando a las muestras 14 mL de acetona, luego se taparon los tubos y se sometieron 3 horas en ultrasonido a una temperatura de 35 °C y se descartó la acetona. Posteriormente, se hizo un lavado con EDTA, se agregaron a las muestras 14 mL de EDTA, se taparon los tubos y se sometieron 3 horas en ultrasonido a una temperatura de 35 °C y al final se descartó el EDTA. Acto seguido se hizo un lavado triple con agua 18 MΩ, para éste se agregaron a las muestras 14 mL del agua, se taparon los tubos y se sometieron 15 minutos en ultrasonido a una temperatura de 35 °C y al final se descartó el agua. Luego de estos lavados, se procedió a hacer una digestión ácida con HNO<sub>3</sub>, para ello se agregaron 1,5 mL del ácido a las muestras, se taparon los tubos y se sometieron a ultrasonido a una temperatura de 45 °C, hasta que se produjo la disolución total. Posteriormente se adicionó 1 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a las muestras, se sometieron a ultrasonido durante 3 horas a una temperatura de 45 °C y finalmente se enrasaron las muestras a un volumen a 10 mL y se analizaron a través de las técnicas correspondientes.

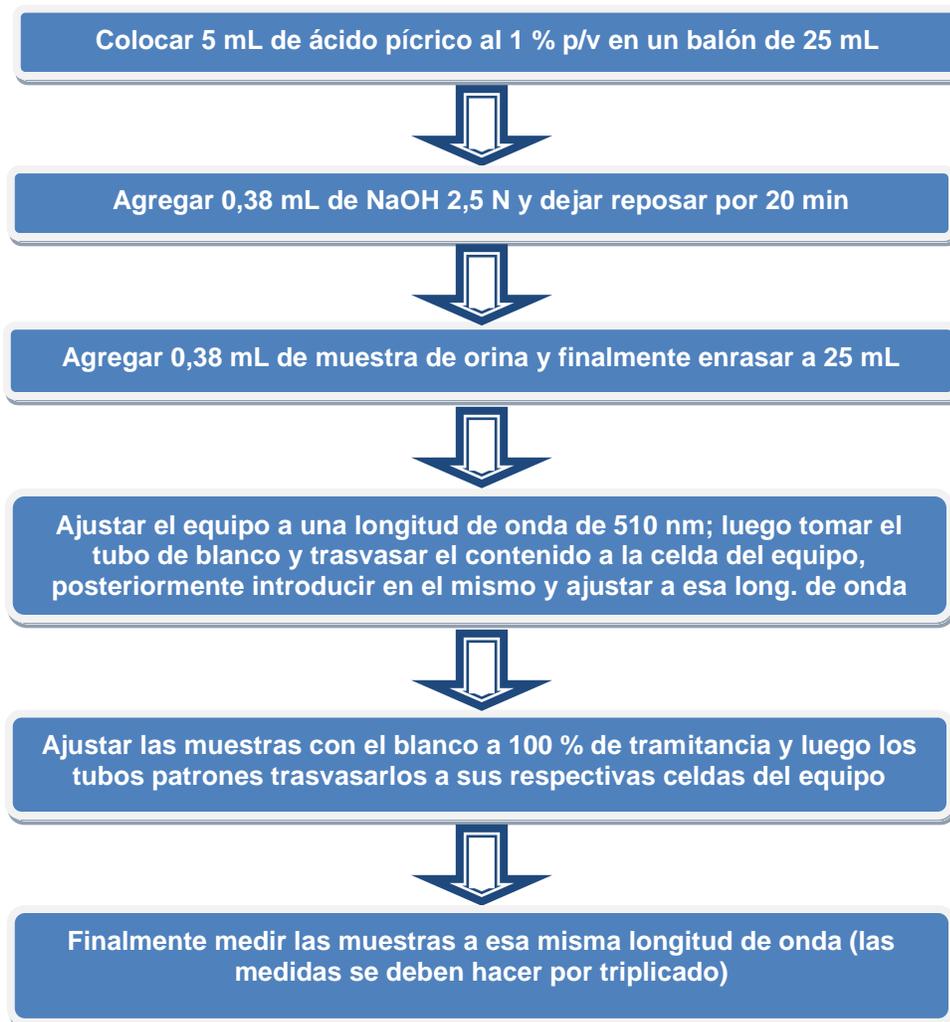


**Figura 11.** Esquema de procedimiento experimental para la digestión del cabello

### **6.3.3.- Tratamiento de muestras y Metodología para determinar creatinina en orina 24 horas mediante Espectrometría Uv-Visible <sup>41</sup>**

Para el tratamiento de orina se procedió a realizar el esquema que se encuentra en la figura 12. Primero se colocaron 5 mL de ácido pícrico al 1 % p/v en un balón de 25 mL, luego se agregaron 0,38 mL de NaOH 2,5 N y se dejó reposar por 20 min. Posteriormente se agregaron 0,38 mL de muestra de orina y finalmente se enrasaron a 25 mL, esto se hizo para cada muestra.

Acto seguido, se ajustó el equipo a una longitud de onda de 510 nm; luego se tomó el tubo de blanco y se trasvasó el contenido a la celda del equipo, posteriormente se introdujo en el mismo y se ajustó a esa longitud de onda; luego se ajustaron las muestras con el blanco a 100 % de transmitancia y después los tubos patrones se trasvasaron a sus respectivas celdas del equipo. Finalmente se midieron las muestras a esa misma longitud de onda (la medidas se hicieron por triplicado).



**Figura 12.** Esquema de procedimiento experimental para el tratamiento de creatinina en orina 24 horas

## 7.- Discusión de Resultados

### 7.1.- Comparación de elementos traza en muestras de orina de niños con Síndrome Espectro Autista y control con respecto a los valores de referencia

Los intervalos de concentración obtenidos para los metales Zn, Cu, Se, Cr, Pb, Cd y Hg, en las muestras de orina 24 horas de una población de 21 niños con Síndrome de Espectro Autista y 9 de grupo control, se presentan en la tabla 3. Los datos originales se encuentran en los apéndices 3 y 4.

**Tabla 3.-** Distribución de concentraciones de Zn, Cu, Se, Cr, Pb, Cd y Hg en muestras de orina 24 horas de una población de niños con Síndrome de Espectro Autista y sanos

Elemento	Intervalo de concentraciones grupo autista (µg/24h)	Mediana obtenida para grupo autista (µg/24h)	Intervalo de concentraciones grupo control (µg/24h)	Mediana obtenida para grupo control (µg/24h)	Intervalo de concentraciones de referencia (µg/24h) <sup>1*</sup>
Zn	21,423 – 504,496	168,777	68,883 – 362,261	158,149	120 – 1300
Cu	24,178 – 518,167	185,342	22,069 – 229,706	82,3354	11 – 68
Se	30,239 – 528,177	237,130	131,91 – 3545,52	872,162	54 – 390
Cr	0,456 – 4,089	2,477	17,833 – 63,515	37,9833	20 – 114
Pb	8,852 – 188,530	77,5549	9,702 – 105,916	39,812	< 20
Cd	< LD	ND	< LD	ND	< 3
Hg	0,066 – 4,280	0,4784	0,355 – 8,226	2,8604	< 5
<sup>2*</sup> Hg <sub>(creatinina)</sub>	0,1616 – 8,630	0,8438	2,8795 – 22,037	4,1788	_____

LD: < al límite de detección de la técnica (no se pudo detectar en el equipo)

ND: no detectable

1\* Los intervalos de referencia son representativos de una población sana, determinados por el laboratorio extranjero Doctor's Data, Inc (Illinois, Estados Unidos). Pues, no existen valores de referencia establecidos con seguridad. Además, estos pueden variar según la región.

2\* Las concentraciones de Hg en orina están en unidades de  $\mu\text{g/g}$  creatinina

De acuerdo a los valores obtenidos para la población de niños con Síndrome de Espectro Autista y niños de grupo control (sanos), en base a los valores de referencia para muestras de orina 24 horas, se puede decir que la mediana alcanzada para el **Zn** se encuentra dentro de los valores de referencia, tanto para los niños de grupo control, como para niños autistas. Los valores de **Cu** para los niños de grupo control se encuentra dentro de estos valores, mientras que los niños del grupo autista, se encuentra muy por encima del intervalo referencial, esto se debe quizás a problemas asociados con la ceruloplasmina que es la proteína que transporta el Cu. Caso contrario ocurre con el **Se**, debido a que los niveles de este metal en los niños del grupo autista se encuentran controlados, es decir, están dentro de los valores de referencia, mientras que para la población sana están por encima de estos valores, esto es de esperarse ya que ya está reportado que la ingesta diaria de Se en Venezuela es mayor que en otros países ( $80 - 500 \mu\text{g/día}$ ), por lo que los venezolanos tienen valores elevados de este metal. Los niveles de **Cr** para los niños sanos se encuentran dentro del intervalo de referencial, mientras que los valores de los niños autistas son muy deficientes, se encuentran muy por debajo de este rango, esto se le puede atribuir a la dieta alimenticia. Con respecto a los valores de **Pb**, en ambos casos los resultados son altos con respecto al valor referencial, las razones pueden ser varias, debido a que hay diversas fuentes de exposición de Pb que experimenta el hombre, las principales son el aire, agua, polvo, suelo, la dieta y en el caso de la gran Caracas, todavía queda Pb proveniente del tetraetilo de plomo utilizado hasta hace cinco años como antidetonante de la gasolina. Finalmente, los valores de **Hg** están dentro del rango normal de los valores referenciales para ambos grupos.

Conforme a la mediana obtenida de niveles de concentración de Hg en orina dada en  $\mu\text{g/g}$  creatinina, mostrada en la tabla 3, se ratifica una teoría, la cual viene dada sobre la base de observaciones realizadas en numerosos estudios, ésta afirma que el Se puede interaccionar en el organismo con una serie de metales (Hg, Pb, Cd, entre otros), impidiendo el efecto de éstos en diferentes tejidos, por lo que se puede deducir el por qué, la liberación urinaria de Hg y de Se, resultó menor en niños autistas que en niños sanos. Por lo tanto, se presume que el Se forma complejos estables con este elemento y su acción protectora no implica un aumento en la excreción de los mismos, pero sí la acumulación paralela de Se con el metal, bien sea con Hg, como sucede en este caso, como con otros metales (Pb, Cd, Cu, etc), actuando en el riñón y en otros tejidos del organismo.<sup>42,43</sup>

## **7.2.- Comparación de elementos traza en muestras de cabello de niños con Síndrome Espectro Autista y control con respecto a los valores de referencia**

En la tabla 4 se presentan los intervalos de concentración de los elementos traza en estudio para una población autista (42 niños) y medianas respectivas las cuales serán comparadas con los intervalos de concentraciones de un grupo control (8 niños) en muestras de cabello. Los datos originales se encuentran en los apéndices 1 y 2.

**Tabla 4.-** Distribución de concentraciones de Zn, Cu, Se, Cr, Pb, Cd y Hg en muestras de cabello de una población de niños con Síndrome de Espectro Autista y grupo control.

Elemento	Intervalo de concentraciones grupo autista ( $\mu\text{g/g}$ )	Mediana obtenida para grupo autista ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo de concentraciones grupo control ( $\mu\text{g/g}$ )	Mediana obtenida para grupo control ( $\mu\text{g/g}$ )	Intervalo de concentraciones de referencia ( $\mu\text{g/g}$ )
Zn	31,997 – 426,817	103,186	61,307 – 426,817	119,186	140 – 220
Cu	1,529 – 30,4038	7,9165	3,353 – 33,463	4,8304	11 – 37
Se	0,209 – 22,490	3,0324	16,806 – 24,636	20,0416	0,55 – 1,1
Cr	0,421 – 1,6564	0,651	1,186 – 2,120	1,6257	0,40 – 0,65
Pb	0,019 – 7,343	2,6392	0,247 – 3,2764	1,5776	< 0,60
Hg	0,055 – 2,642	0,5644	0,3679 – 4,237	0,5954	< 0,80
Cd	< LD	ND	< LD	ND	< 0,050

LD: < al límite de detección de la técnica

ND: no detectable

Se puede apreciar que en el caso del Zn las medianas obtenidas para la población de niños con Síndrome de Espectro Autista y niños de grupo control, son relativamente más bajos que los valores de referencia en muestras de cabello. Igual tendencia se presenta en el caso del **Cu** donde los valores están muy por debajo de los intervalos de referencia para este metal. En contraste, el **Se** presenta un rango de concentración muy elevado con respecto a estos valores para ambos grupos, y más aun, las concentraciones del grupo control. Los valores de **Cr** en la población de niños con Síndrome Espectro Autista, están justo en el límite superior de los valores de referencia, mientras que los de niños sanos están un poco por encima de los mismos. Con respecto a los resultados obtenidos para el **Pb**, en ambos grupos el valor es elevado con respecto a los valores referenciales, al igual que ocurre con los valores obtenidos en las muestras de orina, siendo las mismas causas anteriormente

mencionadas. Finalmente, los valores de **Hg** están dentro del rango normal de los valores referenciales para ambos grupos.

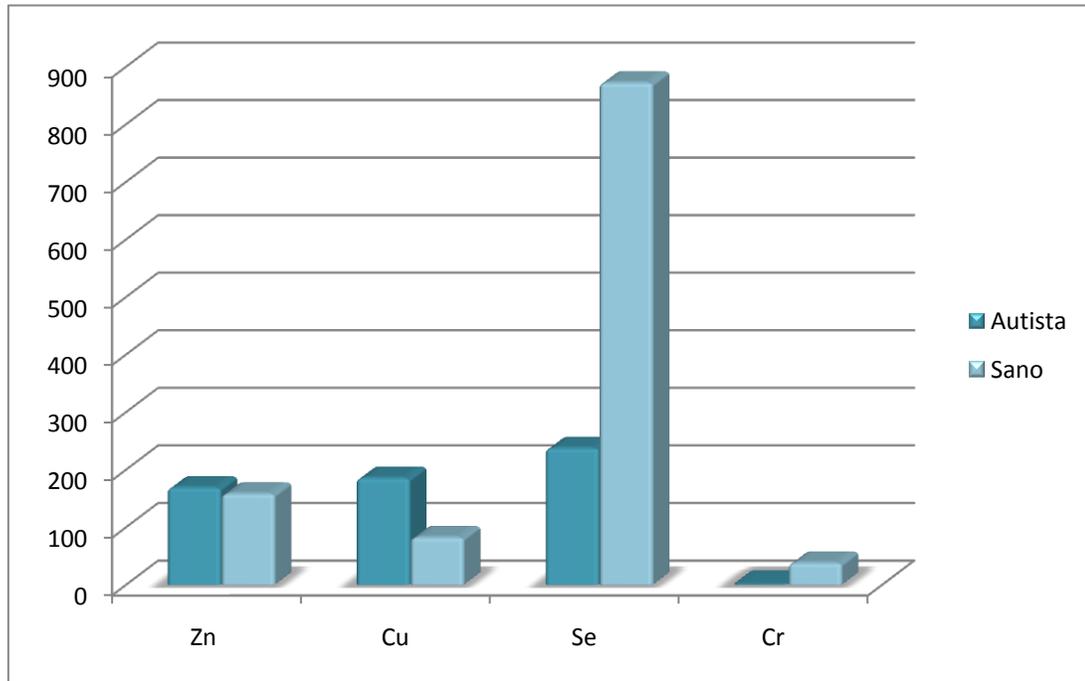
En resumen, se puede observar que los resultados en cabello tanto de Zn como los de Cu (elementos esenciales) se encuentran por debajo de los valores de referencia, esto puede indicar que el aporte de nutrientes esenciales de la alimentación de los niños venezolanos, no está satisfaciendo los requerimientos necesarios, o simplemente a que los valores normales de estos metales oscilan entre los encontrados para niños de Venezuela. Los elementos como Se, Cr y Pb, están todos por encima de los valores de referencia, éste último específicamente, puede ser debido a que todavía se encuentra un remanente de este metal en el ambiente. Y con respecto al Hg, éste se encuentra por debajo de los valores de referencia.

### **7.3.- Comparación de las concentraciones de elementos en cabello y orina en poblaciones autistas respecto a una control.**

#### **◆ Muestras de Orina**

En la figura 13 se presenta un gráfico de barras de las concentraciones ( $\mu\text{g}/24\text{h}$ ) en función de los elementos, en el cual se muestran las tendencias encontradas para los elementos esenciales en muestras de orina.

### Elementos esenciales (Zn, Cu, Se y Cr)



**Figura 13.** Diagrama de barras de comparación entre niños autistas y sanos en orina 24 horas para elementos esenciales.

◆ **Selenio:** Como se puede ver en la figura 13, de acuerdo a los datos obtenidos de las concentraciones de Se en muestras de orina 24 horas en la población autista la excreción vía urinaria del metal estuvo dentro de los valores de referencia reportados, mientras que la frecuencia en la excreción del elemento por vía urinaria en el grupo control fue mucho mayor y además se encontró por encima de los valores permisibles, indicando así en la estadística un p-valor (0,00375256) por debajo de 0,05, demostrando mediante la prueba de Mann-Whitney W (prueba utilizada para comparar medianas de dos muestras) que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de ambas poblaciones, para un nivel de confianza del 95,0 %.

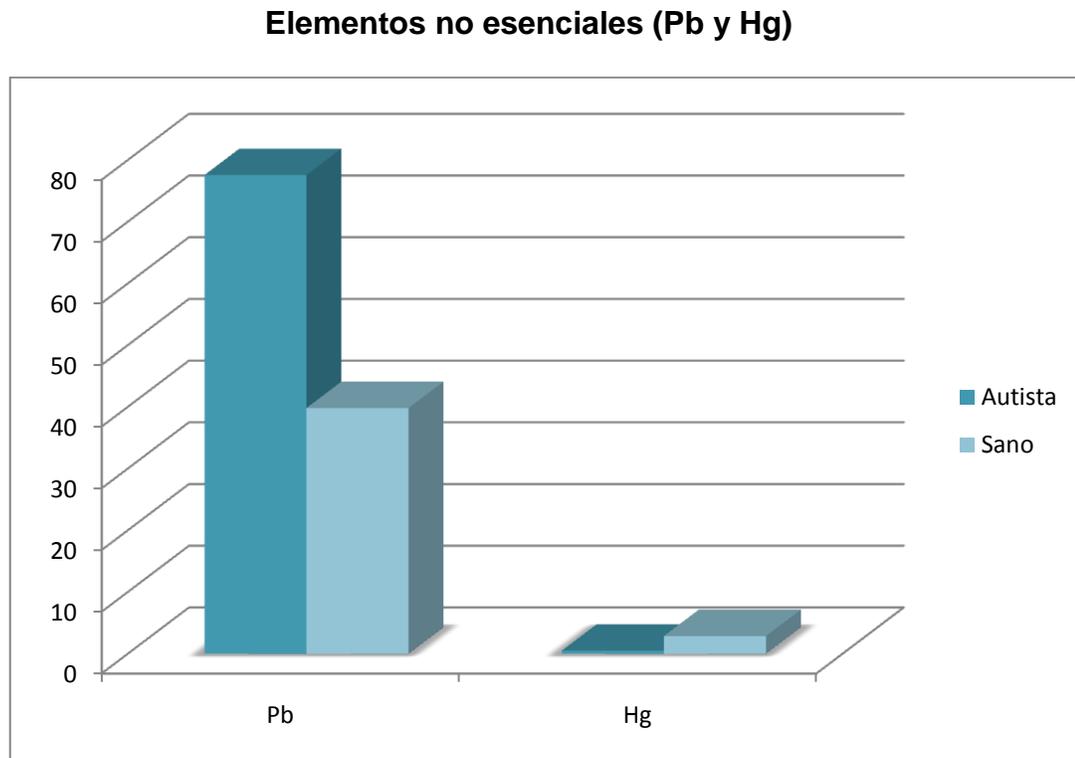
◆ **Zinc:** La población autista se caracterizó por presentar niveles de Zn dentro de los niveles normales reportados, caso semejante ocurrió con la población de grupo control, puesto que de igual forma los valores obtenidos dieron dentro del rango de los valores de referencia. Según las pruebas estadísticas de Mann-Whitney W, se obtuvo que el valor p, estuvo por encima de 0,05, indicando que no hubo diferencia significativa entre las medianas de ambas poblaciones. Por lo tanto, se puede decir que la excreción por vía urinaria de Zn es relativamente normal para dichos grupos.

◆ **Cobre:** Tanto para el grupo autista como para el grupo control, los niveles de Cu estuvieron elevados con respecto al referencial, aún más altos en los de niños autistas. Punto que concuerda con las pruebas estadísticas de Mann-Whitney W, las cuales dieron como resultado que existe diferencia significativa entre las medianas de ambas poblaciones, pudiéndose observar en la figura 13. Concluyéndose se puede indicar que la excreción vía urinaria de Cu es mayor en los niños del grupo autista que la de niños sanos, a pesar de que ambos se encuentran por encima de los valores referenciales.

◆ **Cromo:** La excreción de este metal, fue bastante baja en el grupo autista en comparación con los valores del grupo control, los cuales los últimos están dentro del rango de concentraciones de referencia, mientras que los del grupo autista se encuentran muy por debajo de éstos. Según la prueba de Mann-Whitney W, el valor p (0,004305) está por debajo de 0,05, lo cual indica que existe diferencia significativa entre las medianas de las dos poblaciones, como se puede observar en la figura 13.

Para los elementos no esenciales (Pb y Hg) se presenta un gráfico a continuación (figura 14), en el cual se muestran las tendencias de las concentraciones

( $\mu\text{g}/24\text{h}$ ) de estos dos elementos en estudio para comparar las poblaciones autista y control en muestras de orina.



**Figura 14.** Diagrama de barras de comparación entre niños autistas y sanos en orina 24 horas para elementos no esenciales.

◆ **Plomo:** Para este elemento el comportamiento en las poblaciones objeto de estudio, fue elevada con respecto a los valores de referencia para ambos grupos, la excreción fue mayor en el grupo autista que en el grupo control, indicando, como se muestra la figura 14, que da como resultado, según las pruebas estadísticas, un valor p (0,0127869) por debajo de 0,05, lo que mostró que existe diferencia significativa en ambas poblaciones.

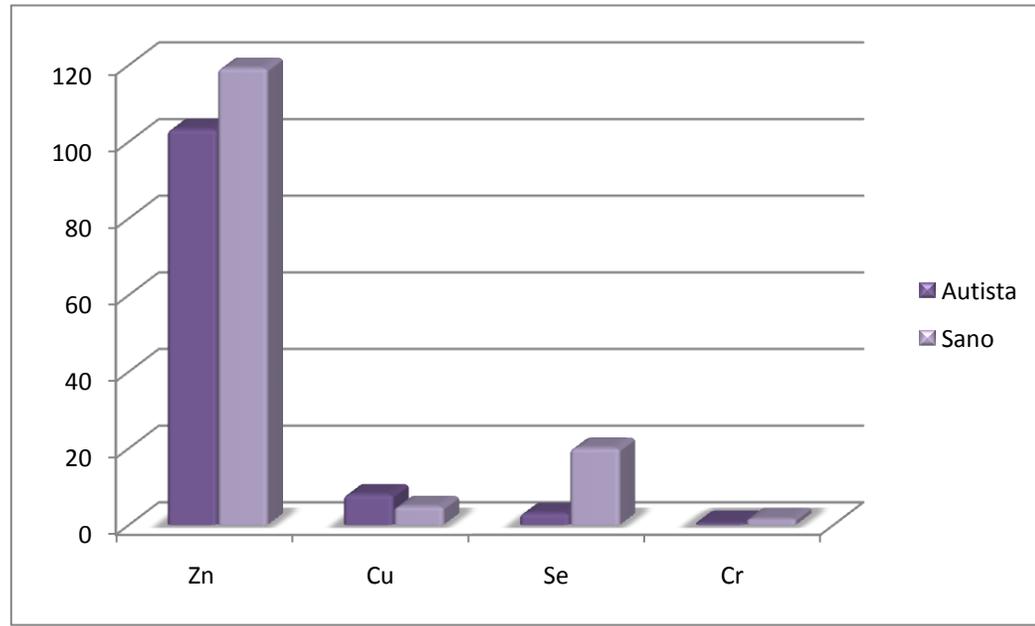
◆ **Mercurio:** Las concentraciones obtenidas para este metal se encuentran por debajo de los valores máximos permisibles para este tipo de muestras en ambas poblaciones, sin embargo, la excreción de Hg fue mayor en el grupo de niños sanos que en los niños del grupo autista, indicando según las pruebas estadísticas realizadas que existe diferencia significativa, no muy notoria a nivel gráfico pero si a nivel estadístico, obteniendo un valor p de 0,000103, muy por debajo del valor estipulado por la prueba de Mann-Whitney W, a pesar de esto, hubo niños de la población de grupo control que los valores de Hg se encontraban por encima de los valores de referencia.

En resumen, para las muestras de orina, la excreción de los elementos Zn, Cu y Pb fue mayor en niños autistas que en sanos. Caso contrario ocurrió con los elementos Cr, Se y Hg.

### ◆ **Muestras de Cabello**

En la figura 15 que se muestra a continuación, se presenta un gráfico de barras de coordenada "x" los metales y coordenada "y" concentraciones expresadas en  $\mu\text{g/g}$ , en muestras de cabello donde se observan las tendencias encontradas para elementos esenciales en una población autista con respecto a una control.

### Elementos esenciales (Zn, Cu, Se y Cr)



**Figura 15.** Diagrama de barras de comparación entre niños autistas y sanos en cabello para elementos esenciales.

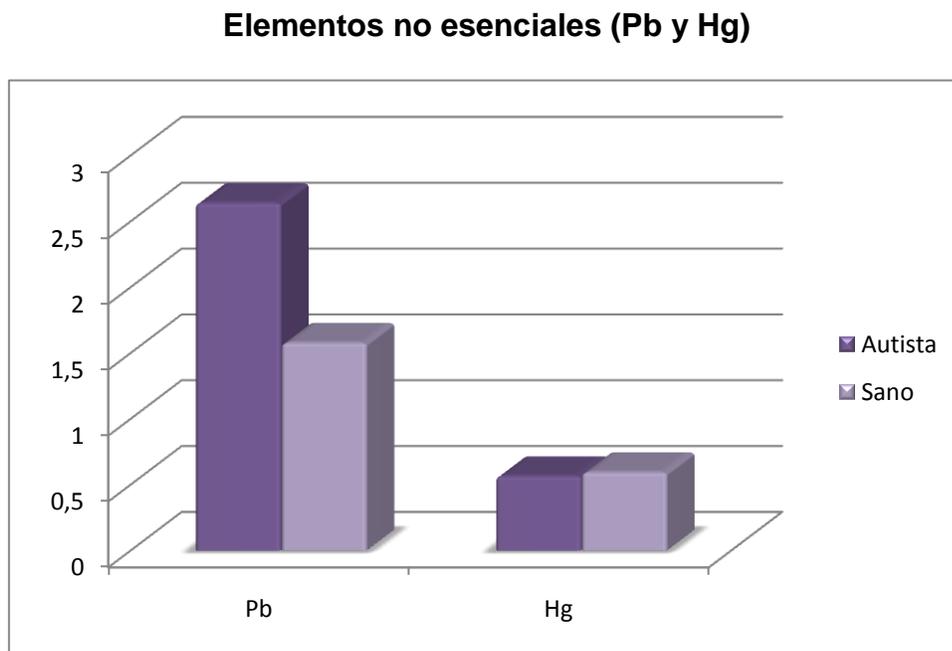
Los resultados obtenidos de las concentraciones de **Se** en muestras de cabello, tanto para la población autista como para la población control, estuvieron por encima de los valores de referencia, indicando, mediante la prueba de Mann-Whitney W, que existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de ambas poblaciones para un intervalo de confianza del 95,0 %.

Caso contrario ocurrió con **Zn**, el cual dio como resultado según la prueba de Mann-Whitney W, que no existe diferencia estadísticamente significativa entre las medianas de ambas poblaciones (ver figura 15), puesto que dio un valor p (0,162139)

mayor a 0,05. Adicional a esto, los valores obtenidos de las concentraciones de Zn en muestras de cabello, tanto para la población autista como para la población control, estuvieron por debajo de los valores de referencia.

De forma similar al Zn, los valores de **Cu** en las muestras de cabello también se encontraron por debajo del rango de referencia para ambas poblaciones. A pesar de ello, a razón de las pruebas estadísticas realizadas muestra que no existe diferencia significativa en las medianas de estos grupos, puesto q su valor p se encuentra por encima del valor limitante de esta prueba.

Para el **Cr**, los valores de concentraciones en cabello para la población autista se encuentra justo en el límite superior de los valores de referencia mientras que para los de grupo control están por encima del intervalo referencial, indicando según las pruebas estadísticas que existe diferencia significativa entre las medianas de ambas poblaciones, lo cual concuerda con la figura 15 en la que se observa de manera clara su diferencia.



**Figura 16.** Diagrama de barras de comparación de medianas de concentraciones entre niños autistas y sanos en cabello para elementos no esenciales.

Para el **Pb** las concentraciones obtenidas en cabello de ambas poblaciones se encuentran por encima de los valores de referencia. A pesar de que gráficamente se observa que existe diferencia, según la prueba estadística de Mann-Whitney W, no existe diferencia significativa entre las medianas de la población de grupo control y autista, debido a que su valor p se encuentra por encima del valor limitante de esta prueba.

Finalmente, al igual que para la muestra de orina, las concentraciones obtenidas de **Hg** en cabello de ambas poblaciones se encuentran por debajo de los valores de referencia, ambos valores de medianas muy semejantes entre ellos, siendo congruente con la prueba estadística de Mann-Whitney W al mostrar que no existe diferencia significativa para dichas poblaciones.

En resumen, para las muestras de cabello, la eliminación de los elementos Cu y Pb fue mayor en los niños autistas que sanos. Caso contrario, ocurrió con el resto de los elementos.

En general, estas diferencias entre las poblaciones de grupo control y autista puede asumirse al factor alimentación (nutrición), ya que éste está asociado al desarrollo no sólo del autismo, sino a múltiples enfermedades, debido a que cada elemento esencial (Zn, Cu, Se y Cr en este caso) cumple roles específicos que permiten el normal desempeño de todos los procesos vitales del organismo y, la alimentación como principal sustento del cuerpo juega un papel importante en el suministro de cantidades adecuadas de los mismo. Asimismo, se le pueden atribuir a otros factores como lo son posiblemente, la ingesta de vitaminas y/o minerales que no son compatibles con la actual bioquímica corporal, medicamentos, la acumulación de metales tóxicos en el medio ambiente y hasta herencia de patrones minerales de los padres.

Sin embargo, es importante destacar que los niños autistas se caracterizan por poseer un sistema gastrointestinal inmaduro, muy sensible, que favorece la aparición de alergias alimentarias, intolerancia hacia alimentos a base de trigo, lactosa entre otros. Es por ello que se están realizando tratamientos para controlar los rasgos del autismo, el cual ha sido en base a dietas libres de gluten y caseína, así como también quelación con agentes como EDTA y DMSA, los cuales son los más usados.

Asimismo, puede adjudicarse el factor contaminación a la intoxicación de elementos tóxicos como Pb y Hg que, probablemente, queda como remanente en la atmósfera, en las pinturas, en las aguas, en los suelos, en especies marinas, entre otras.

A pesar de esto, es importante acotar que no todos los organismos reaccionan igual ante estímulos semejantes, no tienen el mismo metabolismo, por lo cual se asume de manera similar que otro de los agentes importantes en este tipo de condición es el factor genético, el cual aumenta la vulnerabilidad del individuo. Ocasionando así, en algunos casos, el déficit de elementos esenciales o exceso de los elementos tóxicos para el organismo, así como también factores ambientales y factores anímicos perjudiciales, que pueden llegar a desarrollar del Síndrome Espectro Autista.

#### **7.4.- Comparación de las concentraciones de los elementos en muestras de cabello con respecto a muestras de orina 24 horas**

Los resultados obtenidos, son útiles para establecer comparaciones entre los niveles de los metales en cuestión de las muestras de cabello y orina 24 horas de una población control (niños sanos) y una población autista.

La discusión en esta etapa está orientada en dos grupos de elementos, esenciales y no esenciales, donde se ve con claridad si existe o no diferencia en las medianas de concentración de los diferentes elementos en cabello y orina para las poblaciones autista y control.

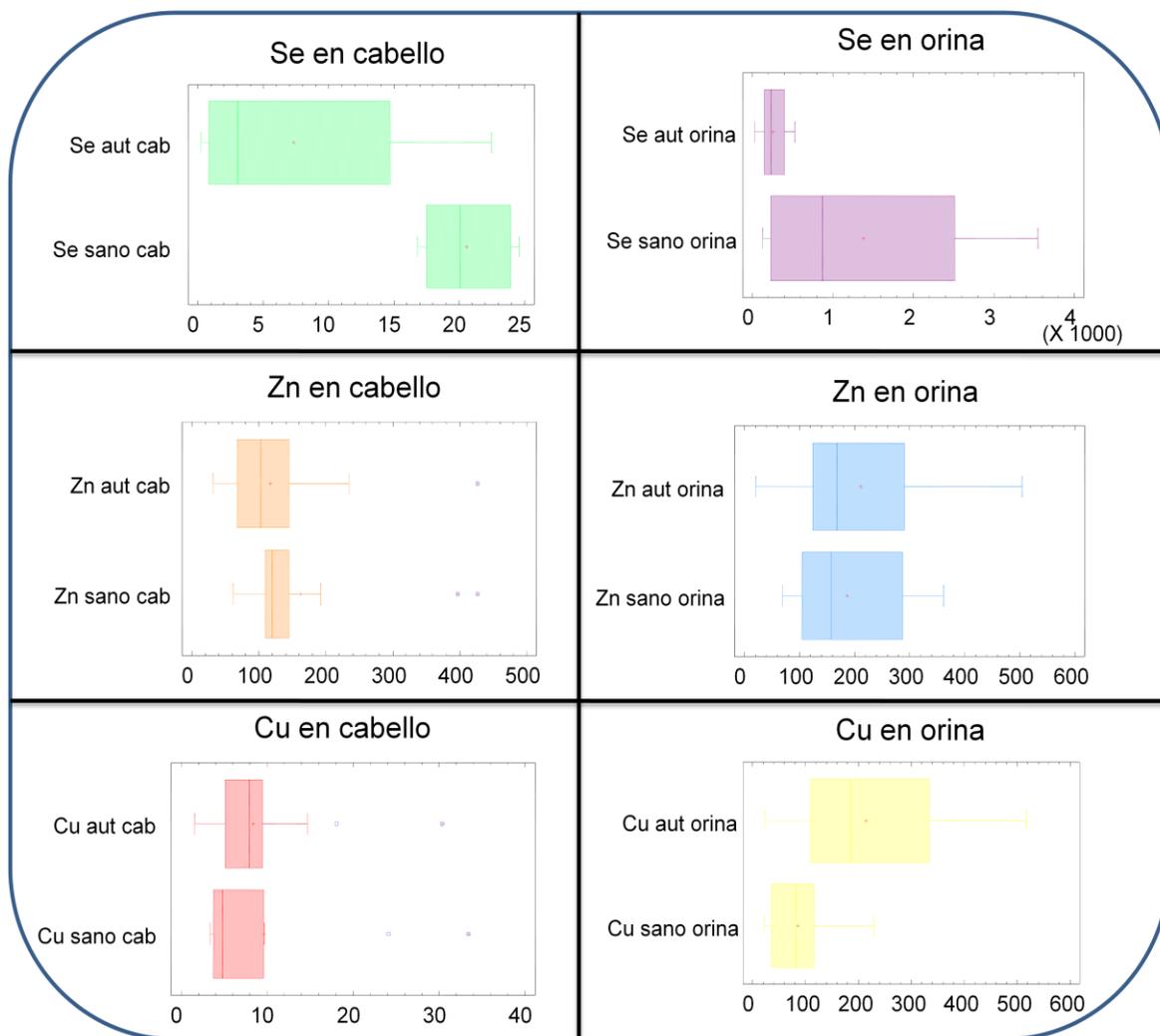
Para los elementos esenciales (Zn, Cu, Se y Cr), se puede decir, luego de realizar el estudio, que tanto para las muestras de cabello como para las muestras de orina 24 horas en **Se**, según la prueba de Mann-Whitney W, dio como resultado que existe diferencia significativa entre ambas poblaciones, indicando que hubo discrepancia entre las medianas de cada una de ellas, arrojando así el mismo resultado en ambas muestras. Asimismo, se pudo determinar en **Zn**, que a pesar de que los valores de medianas en las muestras de orina están dentro de los valores de referencia

y los de cabello están por debajo de los valores reportados, según la prueba de Mann-Whitney W, para efectos del cabello y orina dio como resultado que no hubo diferencia significativa para ninguna de las dos poblaciones, indicando que no hubo discrepancia entre las medianas de cada una de ellas, arrojando así el mismo resultado en las muestras en cuestión. En cuanto al **Cu**, si hubo discrepancia entre los resultados obtenidos en cabello en comparación con los de orina, puesto que, a pesar de que no hubo diferencia significativa entre las medianas de las dos poblaciones para el cabello si existe diferencia en la orina, por lo cual no da el mismo resultado. Se pudo llegar a la conclusión que para el **Cr**, los valores obtenidos según la prueba de Mann-Whitney W, dieron como resultado que existe diferencia significativa entre ambas poblaciones, tanto para las muestras de cabello como para las muestras de orina, arrojando así el mismo resultado en ambas muestras. Esto se puede percibir en las figura 17 y 18 (continuación)

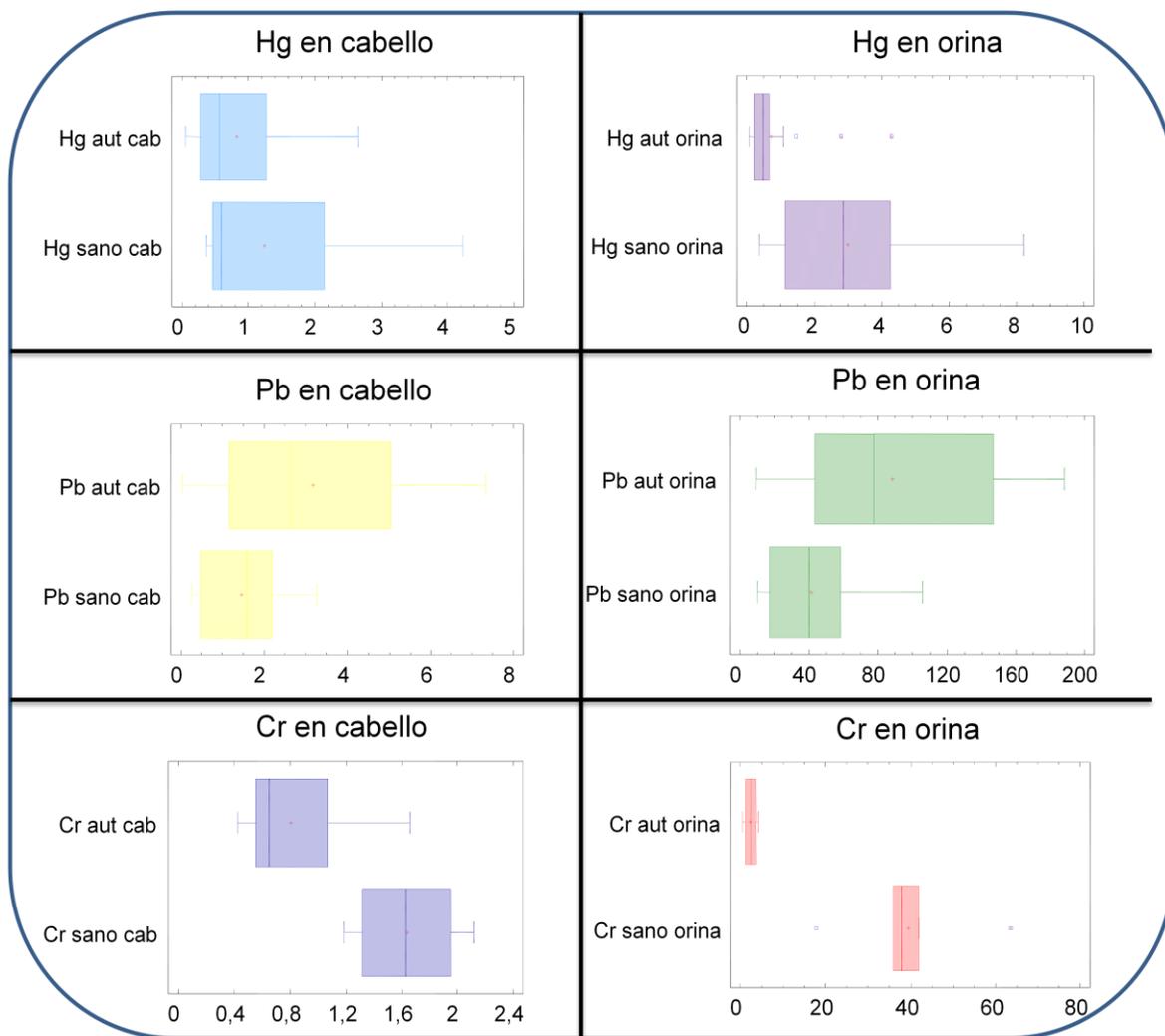
Ahora bien, para los elementos no esenciales (Pb y Hg), con respecto al **Pb**, los valores obtenidos de concentraciones en cabello dieron como resultado para ambas poblaciones fue que no hubo diferencia significativa, mientras que en las muestras de orina existe diferencia significativa, arrojando así resultados diferentes para cada muestra, a pesar de que tengan la misma tendencia. Finalmente, las concentraciones de **Hg**, tanto en las muestras de cabello como las muestras de orina, arrojaron resultados distintos, ya que en las muestras de cabello no existía diferencia significativa entre los resultados de las medianas de ambas poblaciones mientras que en las muestras de orina si existía diferencia.

En las figuras 17 y 18 (continuación) se presentan unos gráficos de cajas y bigotes donde se observa la tendencia de las medianas de las concentraciones que hay

para los elementos en las poblaciones por cada muestra, pudiendo comparar así las muestras de cabello y orina para cada uno de los elementos en estudio.



**Figura 17.** Diagramas de cajas y bigotes de las concentraciones de cabello y orina para Se, Zn y Cu



**Figura 18. (Continuación)** Diagramas de cajas y bigotes de las concentraciones de cabello y orina para Cr, Pb y Hg.

A continuación se muestra la tabla 5 donde se observan mediante los resultados obtenidos la relación entre cabello y orina de los elementos que tienen objeto en este análisis, la cual tiene por utilidad verificar si dan la misma información las muestras de orina y cabello.

**Tabla 5.-** Comparación de medianas de los elementos en cabello y orina de niños autistas con respecto a los sanos.

Metal	Cabello	Orina
Zn	+ (N)	+ (N)
Cu	+ (N)	+ (S)
Se	- (S)	- (S)
Cr	- (S)	- (S)
Pb	+ (N)	+ (S)
Hg	- (N)	- (S)
Hg/g creatinina	-----	- (S)

+ y - = indican quienes tienen mayor valor de concentraciones autista con respecto a control.

(N) = no existe diferencia significativa entre las medianas de las concentraciones.

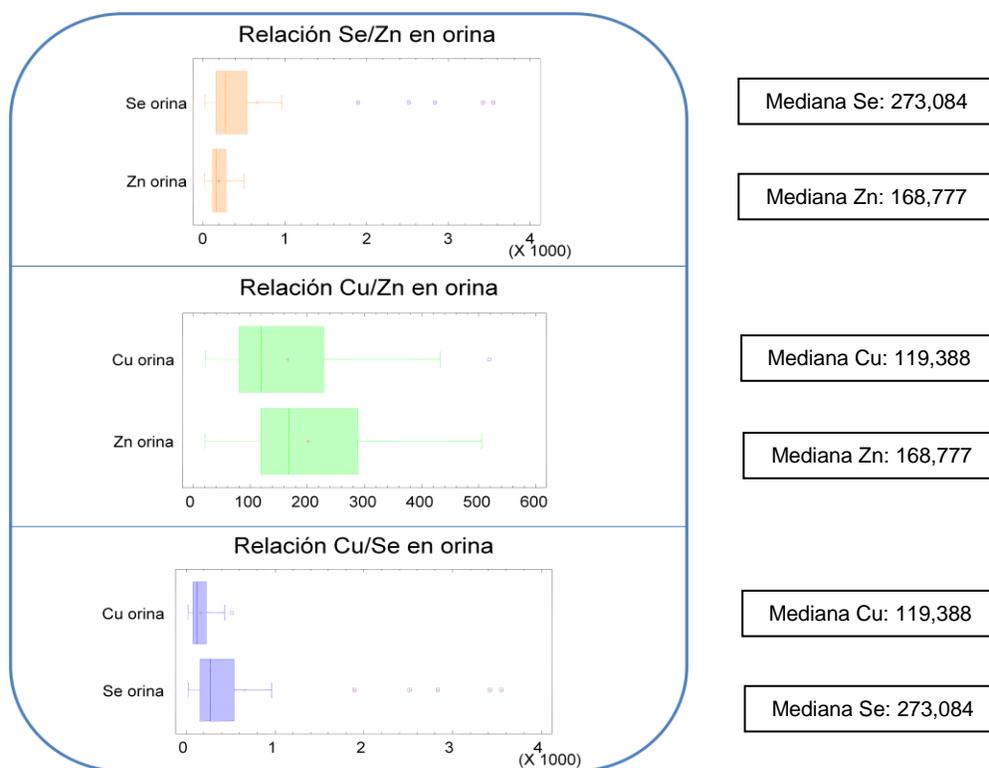
(S) = existe diferencia significativa entre las medianas de las concentraciones.

Estas diferencias entre los valores de orina y cabello pueden catalogarse como normales, ya que se considera que cada espécimen de sangre, de cabello o de orina proveen información específica y algo limitada. No obstante, puede recibirse una visión más completa con relación a procesos metabólicos con los resultados de las pruebas de varias muestras corporales. Sin embargo, lo que indican estos resultados es que para efectos de la determinación de carga metálica en seres humanos, *la orina proporciona más información que el cabello.*

### 7.5.- Relaciones entre elementos en orina y cabello en diagramas de cajas y bigotes

En la figura 19 se presenta un diagrama de cajas y bigotes con las relaciones Se/Zn, Cu/Zn y Se/Cu, la cual compara el comportamiento y/o tendencia de un elemento con respecto a otro en las muestras de orina. Se observa que mientras la excreción de Se en la orina aumenta, la del Zn disminuye y viceversa, lo que nos lleva a concluir que estas tendencias son inversamente proporcionales, esto mismo ocurre con

la relación Cu/Se. Adicionalmente observamos que en la orina existe una diferencia significativa entre las medianas de las concentraciones de los elementos Se/Zn y Cu/Se, ya que constantemente prevalece en ellos una competencia en el tracto gastrointestinal por proteínas, lo cual afecta su absorción. Mientras que en la relación Cu /Zn, a medida que uno de ellos aumenta o disminuye la concentración, el otro también, es decir, tienen la misma tendencia, esto ocurre al ser inducidos por las metalotioneinas, que no son más que una familia de proteínas no enzimáticas con alto contenido en azufre y metales, las cuales juegan un papel importante en la fijación de algunos oligoelementos y en algunas células. Por tanto, se puede afirmar que para estos dos elementos, no existe diferencia significativa entre las medianas de concentración, a diferencia de las relaciones de metales mencionadas al comienzo del párrafo.



**Figura 19.** Relación Se/Zn, Cu/Zn y Se/Cu en orina.

## 8.- Conclusiones

---

- ◆ Se determinó que para las muestras de orina y cabello la eliminación de Cu y Pb fue mayor en niños autistas que sanos. Por otro lado, la de Se, Cr y Hg fue mayor en la población control que en la autista por ambas vías y la excreción de Zn en orina fue mayor en autistas que sanos, caso contrario ocurrió con el cabello, esto contribuye a fijar el tratamiento que se debe seguir para su eliminación en niños autistas prioritariamente.
- ◆ Se comparó el contenido de los elementos traza en niños autistas con el de un grupo control, observándose que el cabello y la orina proporcionan la misma información para los elementos Zn, Se y Cr, no así para los elementos Pb, Cu y Hg, indicando que para los primeros elementos, se pueden realizar cualquiera de las dos pruebas (cabello y orina) y para las de los segundos serían recomendable realizar pruebas específicas.
- ◆ Se estudió la existencia de posibles relaciones entre los elementos traza en niños con síndrome de espectro autista y niños sanos como lo son relación Se/Zn, Cu/Se y Cu/Zn concluyéndose que las tendencias de los dos primeros eran inversamente proporcionales, mientras que para la relación Cu/Zn fue directamente proporcional, presentando en este último, mayor excreción en niños autistas que sanos.
- ◆ Se determinó que en el caso del cabello, los elementos esenciales Zn y Cu estuvieron siempre por debajo de los valores referenciales para ambas

poblaciones, mientras que el Pb siempre estuvo por encima de los intervalos de referencia y el Hg estuvo dentro de los mismos en ambos grupos.

- ◆ En los análisis realizados a la orina, la concentración de los elementos esenciales Cr (niños autistas) y Zn (grupo control) fueron menores a las referenciales. Por otro lado, las concentraciones de Pb en niños autistas fue mayor a la referencial y menor en el grupo control, mientras que el Hg estuvo dentro de los valores de referencia.

## 9.- Referencias Bibliográficas

---

- [1] Fejerman, Arroyo y col. (1994) **“Autismo infantil y otros trastornos del desarrollo”**. 1ª ed. Ed Paidós.
- [2] Meneghello JR, Fanta E y col. (1997) **“Pediatria”**. 5ª ed. Ed Medica Panamericana.; 401:2329-2337
- [3] Kaplan H, Sadock B, Grebb J. (1996) **“Sinopsis de psiquiatria: ciencias de la conducta, psiquiatria clínica”** Editorial Medica Panamericana 7 ed. cap 38: 1072-1083
- [4] **Liga de Intervención Nutricional contra Autismo e Hiperactividad A.C. (LINCA)**
- [5] (1994) **Manual Estadístico y Diagnóstico de los Trastornos Mentales**. Cuarta Edición (DSM-IV).
- [6] Ulmer D.D.(1977) **“Trace elements”**. N Engl J Med; 297: 318-21.
- [7] Underwood EJ. (1977) **“Trace elements in human and animal nutrition”**. 4 ed. Academic Press, New York.
- [8] Li TK, Vallee BL. (1978) **“The biochemical and nutritional role of trace elements”**. En: MG Wohl, RS Goodhart (eds). *Modern Nutrition in Health and Disease*. Lea & Feiger, Philadelphia. pag: 377
- [9] **“Vitaminas y Elementos Trazas”** Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Chile (INTA) Dra. Sandra Hirsch

- [10] Hambridge, K., N. F. (1987) **“Zinc, Trace Elements in Human and Animal Nutrition”**, ed. by Academy Press, New York, pp. 1-37.
- [11] NCR, (1980) **“Mineral Tolerance of Domestic Animals”**, ed. by National Academy of Ciens (Washington, D.C).
- [12] Van Campen, D. (1991) **“Trace Elements in Human Nutrition”**, (Madison, WI), pp. 663-701.
- [13] Toepfer, E.W. (1977) **“Preparation of Chromium-Containing Material of Glucose Tolerance Factor Activity from Brewer’S Yeast Extracts and by Synthesis”**, ed. by Foof. Chem 25), pp. 162-66.
- [14] Anderson, R.A. (1987) **“Chromium, Trace Elements in Human and Animal Nutrition”**, ed. by Academic Press (San Diego, C.A), pp. 225-44.
- [15] CDC (1991) **“Preventing Lead Poisoning in Your Children”**, in *Department of Health and Human Services* (Atlanta, GA,).
- [16] Chaney, R.L., Hundemann, P.T, Pamer, W.T and Decker, A.M, (1978) **“Plant Accumulation of Heavy Metals and Phytotoxocoty Resulting from the Utilization of Sewage Sludge and Sludge Compost on Cropland”**. In *National Conference, on Composting Municipal Residues and Sludges’*. (Rockville).
- [17] Friberg, L. and Vostal, (1972) **“Mercury in the Environment”**, (Cleveland, OH).
- [18] Bakir, K., Damluji, S.F, Amin-Zaki, L, Murtadha, M, Khalidi, H.I, Clarson, T.W, Smith and Doherty, R.A (1973) **“Methylmercury Poisonig in Iraq”**, *Science* 181, 230-41.

- [19] Zambrano B. (2004) **“Consideraciones generales sobre el mercurio, el timerosal, y su uso en vacunas pediátricas”**. Rev Med Uruguay; 20:4-11.
- [20] Counter A, Buchanan L, Ortega F. (2005) **“Mercury levels in urine and hair of children in an Andean goldmining Settlement”**. INT J. Environ Health. 11:132-137.
- [21] Ozua P, Lesse M, Woods J, Choi H, Markowitz M. (2003) **“Mercury exposure in an urban Pediatric Population. Ambulatory Pediatrics”**. 3(91):24-26.
- [22] (2001) **Boletín informativo de salud ocupacional y ambiental**. Vol. 2. N° 7. Julio. [http://www.medics-grup.com/ES\\_2001\\_07.html](http://www.medics-grup.com/ES_2001_07.html). Consultado en junio 2005.
- [23] Elghany NA, Stopford W, Bunn WB, Fleming LE. (1998) **“Occupational exposure to inorganic Hg vapor and reproductive outcomes”**. Occup Med (Lond); 48(3):207-208.
- [24] Sandana F. (1996) **“Toxicidad de la amalgama dental”**. Revista ADM. LIII(6):277-281.
- [25] Hudson P, Vogt R, Brondum J, Witherell L, Myers G, Paschal D. (1987) **“Elemental mercury exposure among children of thermometer plant workers”**. Pediatrics. June; 79(67):935-938.
- [26] Mahaffey K, Clickner R, Bodurow C. (2004) **“Blood organic mercury intake: National health and nutrition examination survey, 1999 and 2000”**. Environmental health perspective; (112):5.
- [27] WHO, (1990) **“Environmental Health Criteria, Methylmercury”**, (Switzerland).
- [28] Elinder, C.G, Friberg, L Lind, and Linman, L., (1976) **“Cadmium in Kidney cortex, Liver and Pancreas from Swedish Autopsies”**, in *Environ. Health* 31, pp. 293-302

- [29] Chaney, R.L. (1983) **“Potential Effects of Waste Constituents on the Food Chain”**, (Park Ridge, NJ.), pp. 152-240.
- [30] Epstein, E. (2002) **“Land Application of Sewage Sludge and Biosolids.”**, (Boca Ratón, USA), p. 201.
- [31] M.R.S Fox, (1988) **“Nutritional Factors That My Influence Bioavailability of Cadmium”**, (Qual), pp. 175-80.
- [32] Yamagata, N, Shigematsu, I, (1979) **“Cadmium Pollution in Perspective”**, pp. 1-27.
- [33] Rosales, Mercedes (2009), **“Estudio del contenido de elementos traza en cabello y orina de niños con Síndrome de Espectro Autista”**, Trabajo especial de grado para optar al título de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- [33] Adams, J., Bradstreet, M., Geier, D., Kartzinel, J. and Geier, M. (2003). **A Case-Control Study of Mercury Burden in Children with Autistic Spectrum Disorders.** Journal of American Physicians and Surgeons Volume 8 Number 3.
- [34] Holmes, A., Blaxill, M. and Haley, B. (2003). **Reduced levels of mercury in first baby haircuts of autistic children.** International Journal of Toxicology. Jul-Aug;22(4):277-85.
- [35] Adams, J., et al. (2006). **Toxic Metals and Essential Minerals in the Hair of Children with Autism and their Mothers.** Autism/Asperger's Research Program at Arizona State University.

- [36] Palmer, R., Blanchard, S., Stein, Z., Mandell, D. and Miller, C. (2005). **Environmental mercury release, special education rates, and autism disorder: an ecological study of Texas**. Health & Place, Volume 12, pp. 83–89.
- [37] Lathe, R. (2006). **Heavy metals may be implicated in autism**. New Scientist Magazine, 2553. Page 21.
- [38] Skoog, D., Holler, F. Y Nieman, T. (2001). **Principios de Análisis Instrumental**. 5<sup>ta</sup> edición. McGRAW-HILL. Madrid, España. Págs. 226 -227.
- [39] Pérez, B. (2007). **“Determinación de una metodología para la determinación de elementos traza en cabello por espectroscopia de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado”**. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- [40] Rojas, R. (2008). **“Efecto del método de lavado en la determinación de metales en muestras de cabello por ICP-OES”**. Trabajo especial de grado. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas
- [41] Arévalo, Evelia; Becerra, Gladys; Araujo José Francisco, (1987) **“Análisis Instrumental”**, Editado por el Consejo de Publicaciones de la Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela.
- [42] Organización Mundial de la Salud (1995). **“Inorganic Lead”**. Environmental Health Criteria 165. Ginebra.
- [43] Ganther HE, Goudie C, Sunde ML, Kopecky MJ, Wagner P, Hoeskstra WG (1972). **Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna**. Science 175:1122-1124.

## 10.- Apéndices

**Apéndice 1.-** Concentraciones de los elementos en muestras de cabello de niños con Síndrome de Espectro Autista.

Muestras	Cu [μg/g]	Zn [μg/g]	Hg [μg/g]	Pb [μg/g]	Se [μg/g]	Cr [μg/g]
M1	1,529	42,829	0,697	6,287	1,547	0,432
M2	2,812	31,997	0,472	1,410	2,513	0,551
M3	6,256	39,213	1,354	2,839	2,296	0,530
M4	4,651	93,191	0,192	1,556	3,032	0,656
M5	3,477	84,305	1,173	4,310	2,574	0,649
M6	8,107	174,034	0,245	2,898	5,210	1,344
M7	5,159	58,854	2,635	2,639	2,750	0,552
M8	4,442	42,846	1,099	5,386	2,868	0,654
M9	3,687	134,051	0,265	0,000	3,108	0,691
M10	7,751	234,908	1,206	1,796	1,256	0,421
M11	8,082	49,337	0,171	3,699	0,979	0,562
M12	8,807	79,798	0,647	6,975	0,379	1,320
M13	5,050	126,721	1,176	0,000	0,528	0,468
M14	7,621	95,158	0,243	4,937	0,408	0,438
M15	14,695	50,104	0,424	0,703	0,340	0,573
M16	18,106	106,411	1,328	2,574	0,598	0,615
M18	4,834	66,772	1,458	0,019	0,319	0,553
M19	6,676	103,696	1,328	2,803	0,246	0,602
M20	5,116	68,097	0,224	7,204	0,209	0,743
M21	8,629	174,509	2,642	0,158	0,534	0,623
M22	10,627	49,541	0,981	7,017	0,000	2,172
M23	8,881	109,475	1,003	4,708	0,328	1,009
M24	8,196	225,584	1,709	0,058	8,962	0,425
M25	7,717	142,761	0,079	0,943	6,576	0,563
M26	12,740	124,990	0,405	1,735	8,367	0,557
M27	7,413	122,796	0,379	7,192	6,996	0,589
M28	6,741	80,320	0,106	1,447	21,865	1,123
M30	11,609	56,739	0,333	5,046	11,486	0,916

Continuación:

Muestras	Cu [µg/g]	Zn [µg/g]	Hg [µg/g]	Pb [µg/g]	Se [µg/g]	Cr [µg/g]
M31	12,346	184,253	0,129	3,027	15,235	0,864
M32	9,554	97,158	0,391	1,142	14,368	1,071
M33	8,405	130,012	0,363	4,953	14,706	0,932
M34	9,021	162,576	0,296	0,000	12,705	1,175
M35	6,634	159,484	0,505	2,266	15,657	1,129
M36	7,577	109,240	1,401	0,330	15,517	0,974
M37	4,323	93,008	0,582	0,270	18,791	1,261
M38	8,681	95,963	0,055	2,125	14,138	1,059
M39	8,607	100,252	0,220	0,058	18,170	1,438
M40	179,891	198,783	1,383	0,000	17,332	2,126
F1	9,514	102,686	0,473	6,287	1,547	0,432
F2	12,341	153,795	1,138	7,343	0,841	0,483
F3	10,814	135,841	0,547	7,280	0,793	0,531
F4	30,404	147,469	2,222	1,981	22,490	1,656

**Apéndice 2.-** Concentraciones de los elementos en muestras de cabello de niños sanos.

Muestras	Cu [µg/g]	Zn [µg/g]	Hg [µg/g]	Pb [µg/g]	Se [µg/g]	Cr [µg/g]
C1	155,0925	61,3065	2,1430	36,3897	19,2740	1,1863
C2	3,7420	426,8170	0,6763	0,2474	17,2562	1,3878
C3	4,1159	76,8084	2,2622	0,4671	17,8040	1,2379
C4	9,5848	192,3253	4,2372	2,1899	16,8057	1,5214
C5	875,0011	144,7048	0,5843	0,5141	20,8091	2,1200
C6	33,4629	140,0488	2,4741	2,4157	24,6359	2,0233
C7	24,1801	118,4666	0,5792	1,8463	24,5869	1,8852
C9	144,7788	397,4024	0,4605	1,7548	23,3483	1,7300

**Apéndice 3.-** Concentraciones de los elementos en muestras de orina 24 horas de niños con Síndrome de Espectro Autista.

Muestras	Cu [μg/24h]	Zn [μg/24h]	Se [μg/24h]	Hg [μg/24h]	Cr [μg/24h]	Pb [μg/24h]
<b>M9</b>	180,824	163,991	207,469	0,066	3,824	67,912
<b>M10</b>	120,186	142,752	162,252	0,300	2,712	49,568
<b>M11</b>	81,701	21,423	95,907	0,115	2,243	31,339
<b>M12</b>	24,178	22,579	30,239	0,116	0,456	9,624
<b>M13</b>	135,984	124,688	195,195	0,208	0,000	55,476
<b>M14</b>	58,061	114,073	78,815	0,484	1,441	24,708
<b>M15</b>	178,943	223,203	229,085	0,434	3,300	77,555
<b>M16</b>	421,189	312,963	528,177	0,529	0,000	176,842
<b>M17</b>	56,853	52,285	73,642	0,230	1,032	24,533
<b>M18</b>	343,876	358,801	429,526	0,550	0,000	143,621
<b>M19</b>	192,826	173,563	260,565	0,168	0,000	8,852
<b>M24</b>	432,267	441,664	523,105	0,629	0,000	188,530
<b>M25</b>	213,424	267,632	274,262	1,065	0,000	106,930
<b>M29</b>	317,413	504,496	399,009	0,910	0,000	146,927
<b>M31</b>	518,167	2183,896	278,719	2,794	0,000	147,816
<b>M32</b>	334,393	291,442	420,805	0,599	0,000	161,502
<b>M37</b>	93,393	228,159	134,207	0,136	0,000	43,345
<b>M38</b>	341,015	158,290	448,052	0,359	0,000	164,397
<b>M41</b>	112,778	145,563	145,922	1,461	0,000	54,995
<b>F1</b>	229,368	232,507	271,907	0,478	4,089	86,638
<b>F4</b>	185,342	104,573	237,130	4,280	0,000	91,759

**Apéndice 4.-** Concentraciones de los elementos en muestras de orina 24 horas de niños sanos.

Muestras	Cu [µg/24h]	Zn [µg/24h]	Se [µg/24h]	Hg [µg/24h]	Pb [µg/24h]
<b>C2</b>	119,3879	290,6572	147,1679	0,6787	58,3335
<b>C3</b>	80,9470	73,7887	1895,1722	2,4595	38,7934
<b>C4</b>	140,2415	141,5746	3423,8004	3,2613	64,5761
<b>C6</b>	92,7662	174,7241	131,9057	4,2804	47,4214
<b>C11</b>	229,7063	294,3988	5548,4754	4,2598	105,9159
<b>C12</b>	101,7508	128,1602	2833,3473	3,5313	52,2145
<b>C13</b>	83,7237	286,9908	2515,2747	4,6585	40,8307
<b>C14</b>	116,8409	104,659	3545,5161	4,0581	61,7676
<b>C15</b>	25,2052	78,3873	872,1622	8,2256	12,919

**Apéndice 5.-** Concentraciones de Hg/g de creatinina en orina de niños con Síndrome Espectro Autista y sanos.

Niños Autistas

Muestras	Hg [ $\mu\text{g/g}$ creatinina]
F1	1,7385
F4	8,6304
M9	0,1616
M10	0,5399
M14	1,6088
M16	0,7380
M17	5,0753
M18	3,0994
M19	0,1979
M24	0,2611
M25	1,0068
M26	0,9727
M29	0,2967
M32	0,9512
M34	0,5145
M37	0,2338
M38	0,2006
M41	0,9495

Niños Sanos

Muestras	Hg [ $\mu\text{g/g}$ creatinina]
C2	3,5520
C3	4,1788
C4	2,8795
C6	6,7286
C11	4,9535
C12	3,8284
C13	3,0518
C14	4,6901
C15	22,0366

**Leyenda:**

**M:** muestras de niños masculinos con autismo.

**F:** muestras de niñas femeninas con autismo.

**C:** muestras de grupo control masculinas y femeninas.

Nota: Existen diferencias entre unos apéndices y otros debido a que muestras diferentes, unas muestras las entregaron los representantes y otras no.

**Apéndice 6.-** Estadísticas descriptivas de cabello de una población de niños con Síndrome de Espectro Autista y niños de grupo control

Estadísticas descriptivas	Autista	Control	Autista	Control
Elemento	Zn		Cu	
n (n° de personas)	44	13	42	10
Varianza	4821,66	13354,6	23,1086	109,688
Media	116,538	162,528	8,366	9,688
Desviación típica	69,4381	115,562	4,807	10,474
Intervalo de conc. (µg/g)	31,997 – 426,817	61,307 – 426,817	1,529 – 30,4038	3,353 – 33,463
Mediana	103,186	119,186	7,9165	4,8304
Elemento	Cr		Pb	
n (n° de personas)	42	8	39	11
Varianza	0,1146	0,1272	6,0421	0,9782
Media	0,8033	1,6365	3,1705	1,4569
Desviación típica	0,3385	0,3567	2,458	0,989
Intervalo de conc. (µg/g)	0,421 – 1,6564	1,186 – 2,120	0,019 – 7,343	0,247 – 3,2764
Mediana	0,651	1,6257	2,6392	1,5776
Elemento	Hg		Se	
n (n° de personas)	44	13	43	8
Varianza	0,4699	1,4022	54,6336	10,7035
Media	0,8294	1,2361	7,3278	20,565
Desviación típica	0,6855	1,1841	7,3916	3,2716
Intervalo de conc. (µg/g)	0,055 – 2,642	0,3679 – 4,237	0,209 – 22,490	16,806 – 24,636
Mediana	0,5644	0,5954	3,0324	20,0416

Nota: El número de personas varía debido a que el equipo, no detecto algunas muestras, daban por debajo del límite de detección y no se tomaron en cuenta.

**Apéndice 7.-** Estadísticas descriptivas de orina 24 horas de una población de niños con Síndrome de Espectro Autista y niños de grupo control

Estadísticas descriptivas	Autista	Control	Autista	Control
<b>Elemento</b>	<b>Zn</b>		<b>Cu</b>	
n (n° de personas)	22	14	23	14
Varianza	17119,2	9470,86	18164	3094,4
Media	211,016	186,433	214,368	86,1199
Desviación típica	130,84	97,3183	134,774	55,6273
Intervalo de conc. (µg/24h)	21,423 – 504,496	68,883 – 362,261	24,178 – 518,167	22,069 – 229,706
Mediana	168,777	158,149	185,342	82,3354
<b>Elemento</b>	<b>Cr</b>		<b>Pb</b>	
n (n° de personas)	8	5	23	14
Varianza	1,7687	266,821	3241,82	708,919
Media	2,3871	39,4266	88,2046	41,0024
Desviación típica	1,3299	16,3347	56,937	26,6255
Intervalo de conc. (µg/24h)	0,456 – 4,089	17,833 – 63,515	8,852 – 188,530	9,702 – 105,916
Mediana	2,477	37,9833	77,5549	39,812
<b>Elemento</b>	<b>Hg</b>		<b>Se</b>	
n (n° de personas)	23	14	23	13
Varianza	0,9446	4,4094	20906,3	1,66E+06
Media	0,7322	2,9859	256,358	1380,37
Desviación típica	0,9719	2,0999	144,59	1290,27
Intervalo de conc. (µg/24h)	0,066 – 4,280	0,355 – 8,226	30,239 – 528,177	131,91 – 3545,52
Mediana	0,4784	2,8604	237,13	872,162

Nota: El número de personas varía debido a que el equipo, no detectó algunas muestras, daban por debajo del límite de detección y no se tomaron en cuenta.

**Apéndice 8.-** Formato de folletos informativos entregados a los representantes de los niños con Síndrome de Espectro Autista.

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
CENTRO DE QUÍMICA ANALÍTICA



Determinación de elementos traza  
en cabello y orina de niños de  
espectro autista

**BERNABO FOL:**  
EML CASTILLO

---



Centro de Química Analítica

Apartado de correos 47102.  
Caracas  
1041-A  
Telf. 0212- 241.43.01 /  
Cel. 0412 - 998.73.10  
Correo:  
emilica23110@gmail.com

---

**Preguntas frecuentes**

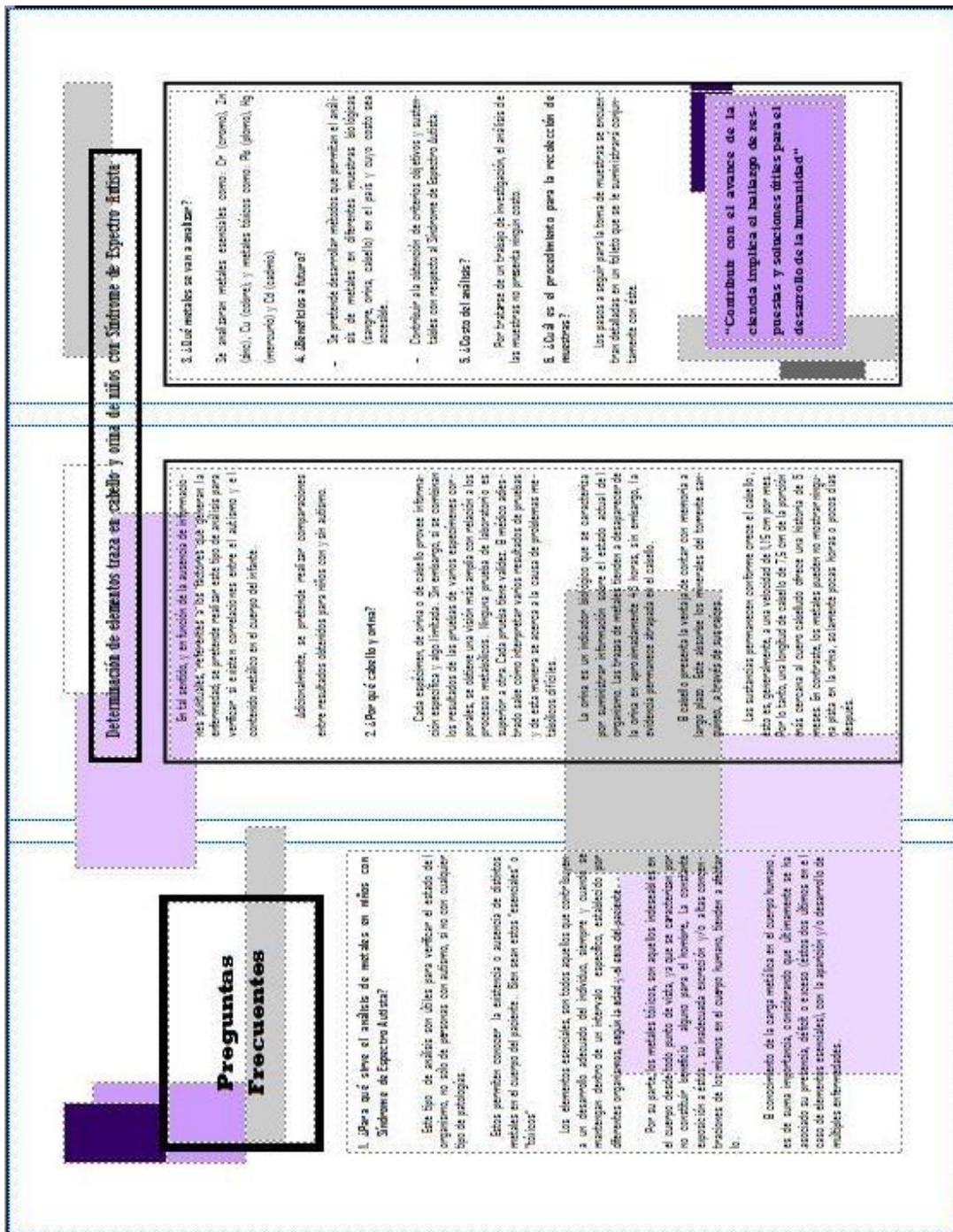
7. ¿Qué material necesito para recolectar las muestras?  
El material necesario le será suministrado en la institución a la que acude su representante.

8. ¿Qué niños participan?  
Todo niño con autismo cuya edad se encuentre comprendida entre 3 y 11 años de edad.

9. ¿En dónde se realizan los análisis?  
Estos se efectúan en los laboratorios pertenecientes al Centro de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

10. ¿Quién dirige el estudio?  
El estudio es un Trabajo Especial de Grado, dirigido por el Dr. José Clemente, profesor de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.

(Adelante)



(Atrás)

**Apéndice 9.-** Formato de folletos de recolección de muestras entregados a los representantes de niños con Síndrome de Espectro Autista.

**Recolección de Muestras**

**B. Muestras de orina**

- Se le suministrará a los representantes de los niños una botella de vidrio color ámbar de un volumen de un litro para la recolección de muestra.
- La toma de la muestra debe tener una duración de 24 horas (la primera de la mañana se descarta, se comienzan a recoger a partir de la segunda micción, y así todas las siguientes hasta la primera micción del día siguiente, incluyendo-la).
- La botella debe mantenerse refrigerada, es decir, tras cada micción del infante debe introducirse en la nevera.
- Una vez finalizado el proceso de recolección de la muestra, mantener la misma refrigerada hasta el momento de su entrega al analista.
- Identificar la botella con todos los datos del niño.



**Determinación de elementos traza en cabello y orina de niños con espectro autismo**



**Centro de Química Analítica**

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
Centro de Química Analítica

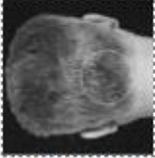
**Contacto:**  
Emil Castillo

Avenida de corcos 47702-Caracas  
1041-A  
Tel: 0041-241.4301 / Cel: 0412-9997310  
Correo: emcas310@gmail.com

Realizado por:  
**EMIL CASTILLO**



(Adelante)

<p><b>Justificación</b></p> <p>En los últimos años, se han incrementado los casos de autismo, como resultado de un aumento significativo en la tasa de personas afectadas y, del desconocimiento de la cura y las causas que la originan.</p> <p>En Venezuela, son pocos los estudios que se han realizado sobre la relación metal-autismo. Además, estos se han limitado al análisis de mercurio (Hg) en sangre y orina. Aun cuando la revisión de otros metales (tanto esenciales como no esenciales tóxicos) para el organismo, es de vital importancia, ya que aportan una información más completa sobre el estado del organismo y, en consecuencia, datos sobre su vulnerabilidad ante afecciones determinadas.</p> <p>Actualmente, la mayoría de los estudios en muestras biológicas (cabello, sangre, orina), que requieren la especificación de concentraciones de diversos metales, son realizadas en laboratorios del extranjero. Tal situación implica además de una mayor inversión, la ausencia de bases de datos referidas a la carga metálica de los niños autistas venezolanos, que permitan establecer correlaciones importantes respecto a la existencia o ausencia en la reconocida metal-autismo.</p>	<p>Por tal motivo, surge la necesidad de realizar investigaciones más amplias que contribuyan al encuentro de datos confiables. Útiles para la creación de bases extensas que favorezcan la dilucidación del origen del espectro autista y, de ser posible, la disminución y/o cura del mismo.</p> <p>Es por ello, que se ha planteado, a partir del análisis de elementos traza en cabello y orina de niños autistas, la búsqueda de fundamentos que aporten información respecto a la influencia del contenido metálico sobre la enfermedad.</p> <p>En este sentido, el estudio se propone como objetivo principal: la determinación del contenido de elementos traza Zn, Cu, Cr, Se, Pb, Cd y Hg en muestras biológicas de niños venezolanos con síndrome de espectro autista empleando técnicas espectroscópicas. Vale la pena destacar que este trabajo es parte de un proyecto del Centro de Química Analítica.</p> <p>Para alcanzar el objetivo principal, se proponen los siguientes objetivos parciales:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Optimizar la metodología de análisis para la determinación Hg en muestras de orina 24 horas, mediante técnicas espectroscópicas.</li> <li>• Determinar las concentraciones de los metales esenciales: Zn, Cu, Cr, Se y no esenciales: Hg, Pb, Cd, en cabello y orina de niños con síndrome espectro autista, a través de técnicas espectroscópicas.</li> <li>• Comparar el contenido de los elementos traza</li> </ul>	<p>en niños autistas con él de un grupo control.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Estudiar la existencia de posibles correlaciones entre la concentración de elementos traza en niños de espectro autista, con factores como la dieta y la severidad del trastorno, empleando estadística multivariada.</li> </ul> <p><b>Recolección de Muestras</b></p> <p><b>A. Muestras de cabello</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Antes de proceder a la toma de la muestra, es necesario limpiar la tijera con acetona para eliminar todo vestigio de grasa y polvo que pudiera quedar en sus superficies de corte. De igual forma, la persona que tomara la muestra debe lavarse las manos antes de proceder a la colección o usar guantes adecuados. Evite la utilización de talco en la preservación de estos. Utilizar tijeras de acero inoxidable o de plástico.</li> <li>• Asimismo, lavar bien el cabello sin que queden restos de químicos (champú, etc)</li> <li>• Luego de que este seco, recorte aproximadamente 1,00g. de cabello de la cabeza occipital de la cabeza del infante. El corte debe realizarse lo más cercano posible al cuero cabelludo. (Ver Figura)</li> <li>• Colocar los mechones de cabello en una bolsa plástica con cierre hermético, identificada con el nombre del niño o niña.</li> </ul>	
--	---	---	---

(Atrás)

**Apéndice 10.-** Encuesta entregada a los representantes para llenarla con la información necesaria sobre el infante y sus padres.



**CENTRO DE QUÍMICA ANALÍTICA**  
 FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE QUÍMICA  
 UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

**PROTOCOLO:** Niveles medios de mercurio (Hg), cadmio (Cd), cromo (Cr), plomo (Pb), zinc (Zn) y cobre (Cu), en la población.

1. IDENTIFICACIÓN DEL INFANTE	
Nombres	Apellidos
Edad	Fecha y Lugar de nacimiento
Dirección/ Teléfono de contacto	
2. ANTECEDENTES	
Patología que presenta	
Medicamentos administrados en los últimos 6 meses	
Patologías de la madre	
Patologías del padre	
¿Existen otros casos de autismo en su familia?/¿Qué parentesco existe entre esa(s) personas y el infante?	
Vacunas aplicadas al infante	

¿El niño ha sido quelado? Especifique									
<b>3. Hábitos nutricionales del niño:</b>									
Carnes	Si		Frecuencia/Semana						
	No								
Vegetales	Si		Frecuencia/Semana						
	No								
Frutas	Si		Frecuencia/Semana						
	No								
Pescado/Productos del mar	Si		Frecuencia/Semana						
	No								
Enlatados	Si		Frecuencia/Semana						
	No								
¿Presenta el infante algún control nutricional y/o dieta determinada? Especifique									
<b>4. Información sobre la madre del infante:</b>									
Profesión					Años de ejercicio				
Alcohol	Si		Desde		Tipo		Frecuencia		
	No		Hasta		Cantidad				
Cigarrillos	Si		Desde		Tipo		Frecuencia		
	No		Hasta		Cantidad				
¿Convive con personas que fuman?						Si		Hogar	
						No		Trabajo	
Café	Si		Desde		Tipo		Frecuencia		
	No		Hasta		Cantidad				
Drogas	Si		Desde		Tipo		Frecuencia		
	No		Hasta		Cantidad				
<b>5. Información sobre el padre del infante:</b>									
Profesión					Años de ejercicio				
Alcohol	Si		Desde		Tipo		Frecuencia		
	No		Hasta		Cantidad				
Cigarrillos	Si		Desde		Tipo		Frecuencia		
	No		Hasta		Cantidad				

□

¿Convive con personas que fuman?				Si		Hogar	
				No		Trabajo	
Café	Si	Desde		Tipo		Frecuencia	
	No	Hasta		Cantidad			
Drogas	Si	Desde		Tipo		Frecuencia	
	No	Hasta		Cantidad			
<b>6. ¿POSEE AMALGAMAS DENTALES?</b>							
Niño	Si			Cantidad			
	No						
Madre	Si			Cantidad			
	No						
Padre	Si			Cantidad			
	No						
<b>7. ¿POSEE PRÓTESIS METÁLICAS?</b>							
Niño	Si			Cantidad			
	No						
Madre	Si			Cantidad			
	No						
Padre	Si			Cantidad			
	No						
<b>8. MUESTRA ENTREGADA</b>							
Orina	Si			Observaciones:			
	No						
Cabello	Si			Observaciones:			
	No						

Este estudio tiene por objetivo recolectar los datos para establecer valores medios de algunos metales pesados. Esta encuesta sólo se usará para este fin.

Gracias por su colaboración.

Br. Emil J. Castillo V.