

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUÍMICA



TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

**ESTUDIO DEL CONTENIDO DE ELEMENTOS TRAZA EN CABELLO Y ORINA DE NIÑOS CON
SÍNDROME DE ESPECTRO AUTISTA.**

Trabajo Especial de Grado
presentado ante la ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la
Br. Mercedes V. Rosales M, para
optar al título de Licenciada en
Química

TUTOR: DR. JOSÉ CHIRINOS

CARACAS, ABRIL DE 2009

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: “Estudio del contenido de elementos traza en cabello y orina de niños con Síndrome de Espectro Autista”. Presentado por la Br. Mercedes V. Rosales M., certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química, opción tecnología.

Dr. José Chirinos
(Tutor)

Dr. Gustavo Pérez
(Jurado)

Dr. Luis Gómez
(Jurado)

Se determinó la concentración de elementos traza (Zn, Cu, Cr, Se, Pb, Cd y Hg) en muestras de cabello y orina de niños con Síndrome de Espectro Autista, con edades comprendidas entre 2 y 15 años, pertenecientes al Centro Integral para la Estimulación Cognitiva y Comunicativa (CIPECC).

Previo al análisis de las muestras, se optimizó la concentración del agente reductor (NaBH_4) y la influencia de diferentes ácidos transportadores (HNO_3 ó HCl), para la determinación de Hg total por CV-AAS. Los resultados obtenidos arrojaron que la concentración óptima de reductor fue 0,2% p/v de NaBH_4 y que el empleo de HCl como ácido transportador produce un aumento en la sensibilidad de la técnica.

También se optimizaron los tiempos de lavado de las muestras de cabello con acetona y EDTA para la determinación de Cd y Hg, obteniéndose finalmente, porcentajes de remoción de aproximadamente 76% y 82% para Cd y Hg, respectivamente. Por tal motivo, los datos que deriven del análisis de estos elementos en cabello, incluirán un error adicional que dependerán de la exposición del individuo a estos metales. Asimismo, se estudiaron posibles problemas de adsorción de Hg al utilizar material de plástico para el análisis de cabello, encontrándose que éstos no adsorben mercurio y pueden ser utilizados de manera confiable.

En total se analizaron 29 muestras de orina y 31 muestras de cabello de niños autistas. La determinación de los elementos Zn, Cu, Cr, Se, Pb y Cd, se realizó mediante espectrometría de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES) y la concentración de Hg total fue determinada por espectrometría de absorción atómica con generación de vapor frío (CV-AAS). Las metodologías de análisis empleadas fueron validadas empleando para algunos elementos el factor de recuperación, partiendo de estándares puros de cada

elemento, y para otros se utilizó material certificado apropiado. Los datos obtenidos fueron tratados empleando el paquete Statgraphic version 5.0 para Windows.

Para las muestras de orina, las concentraciones de Zn y Cr en niños de Espectro Autista mostraron niveles de normales a bajos, para Cu y Se, las medianas presentaron niveles normales. Metales tóxicos como Pb, Cd y Hg, se mantuvieron siempre por debajo de los valores umbrales.

Se comparó la carga metálica, liberadas por vía urinaria, del grupo autista con la población control, encontrándose que existe cierta tendencia por parte de los primeros a excretar cantidades menores de Zn, Cr y Se. En el caso del Hg, la tendencia es inversa, los niños sanos lo liberan en mayores proporciones, además, en niños autistas se observó que la liberación de Hg aumenta a medida que disminuye la severidad del Síndrome. Se hallaron además, correlaciones positivas para la excreción de metales en orina, entre ellas: Pb-Se, Pb-Zn, Hg-Zn, Cu-Zn, Cu-Se y Cu-Pb; que pueden estar indicando la existencia de procesos metabólicos o enzimáticos afectados en el organismo de niños con autismo, capaces de generar déficits de Zn y retención de Hg. Así como también, indicios de que el Se presenta una función protectora hacia elementos como Cu y Pb que puede estar favoreciendo la formación de complejos Se-Pb y Se-Cu que no son excretados por el cuerpo, generando así una menor liberación de Pb por parte de niños de Espectro Autista.

Los resultados obtenidos por el análisis de orina, concuerdan con teorías propuestas en estudios previos, que asocian la menor excreción de Hg y Pb en niños de Espectro autista a dos posibles causas, afecciones en proteínas encargadas de la detoxificación del organismo y la capacidad del Se para formar complejos con Cu, Pb y/o Hg.

En el caso del cabello, la información adquirida fue muy limitada, observándose niveles relativamente normales para todos los elementos analizados.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. Introducción.....	1
II. Revisión Bibliográfica.....	3
2.1 Trastornos o Síndromes del Espectro Autista	3
2.1.1 Aspectos generales.	3
2.1.2 Presentación clínica	5
2.1.3 Causas	7
2.2 Los Elementos Biogénicos	8
2.2.1 Bioelementos secundarios	10
2.2.2 Elementos traza	11
2.2.2.1 Interacciones entre elementos traza.	17
2.3 Técnicas analíticas empleadas para la determinación de metales en niños de Espectro Autista.	20
2.3.1 Plasma óptico inductivamente acoplado (ICP-OES).	21
2.3.1.1 Fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP, Inductively Coupled Plasma)	22
2.3.2 Espectrofotómetro de absorción atómica con generación de vapor frío (CV-AAS).	24
2.4 Estudios sobre la incidencia de los metales pesados en la aparición del Síndrome del Espectro Autista.	25
III. Objetivos.....	30
3.1 Justificación.	30
3.2 Objetivo general.	31
3.3 Objetivos específicos.	31
IV. Parte experimental.....	33
4.1 Equipo.....	33
4.1.1 Espectrómetro de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES).	33
4.1.2 Espectrofotómetro de absorción atómica con generación de vapor frío. (CV-AAS)	34
4.2 Soluciones y reactivos.....	36

4.3 Materiales de referencia.....	37
4.4 Muestreo.....	37
4.5 Metodología experimental.....	38
I.4.5.1 Optimización de los parámetros instrumentales para la determinación de Hg en muestras de orina y cabello por CV-AAS.....	39
I.4.5.2 Optimización de la metodología de análisis de muestras de cabello para la determinación de Hg por CV-AAS y Cd por ICP-OES.....	39
I.4.5.2.1 Optimización del tiempo y número de lavados para la determinación mercurio (Hg) en cabello.....	39
I.4.5.2.2 Estudio de la adsorción de Hg en recipientes de plástico.....	41
I.4.5.2.3 Validación de las metodologías de análisis.....	42
I.4.5.2.4 Validación de las metodologías de análisis.....	43
II.4.5.1 Tratamiento de las muestras.....	43
II.4.5.1.1 Tratamiento de muestras de orina 24 horas.....	43
II.4.5.1.2 Tratamiento de muestras de cabello.....	44
V. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	46
I.5.1 Optimización de los parámetros instrumentales para la determinación de Hg en muestras de orina y cabello por CV-AAS.....	46
I.5.1.2 Estudio de la naturaleza del ácido en la absorbancia, con borohidruro de sodio (NaBH₄) como agente reductor.....	47
I.5.2 Optimización de la metodología de análisis de muestras de cabello para la determinación de Hg por CV-AAS y Cd por ICP-OES.....	47
I.5.2.1 Optimización del tiempo y número de lavados para la determinación Hg en cabello.....	47
I.5.2.2 Estudio de la adsorción de mercurio (Hg) en recipientes de plástico.....	49
I.5.3 Validación de las metodologías de análisis.....	50
I.5.4 Figuras de mérito obtenidas para las metodologías de análisis empleadas.....	52
PARTE II. Análisis de muestras de cabello y orina de niños con Síndrome de Espectro Autista.....	53
II.5.1 Análisis de elementos traza en muestras de orina de niños de espectro autista.....	53
II.5.1.1 Distribución de las concentraciones de elementos traza en muestras de orina de niños de espectro autista, en función del nivel de autismo.....	64

II.5.1.2 Distribución de las concentraciones de elementos traza en muestras de orina de niños de espectro autista, en función de la dieta. ...	65
II.5.2 Análisis de elementos traza en muestras de cabello de niños de espectro autista.	67
II.5.2.1 Distribución de las concentraciones de elementos traza en muestras de cabello de niños de espectro autista, en función del nivel de autismo.....	73
II.5.2.2 Distribución de las concentraciones de elementos traza en muestras de cabello de niños de espectro autista, en función de la dieta. 74	74
VI. Conclusiones	76
VII. Recomendaciones	78
VIII. Referencias Bibliográficas	79
IX. Apéndice.....	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Diferentes características de las principales técnicas analíticas utilizadas para la determinación de elementos traza.....	21
Tabla II. Condiciones de operación del equipo ICP-OES y longitudes de onda de trabajo.....	34
Tabla III. Condiciones de operación para el CV-AAS.	35
Tabla IV. Ecuaciones de la recta obtenidas para las curvas de calibración de los diferentes ácidos de arrastre analizados.	47
Tabla V. Adsorción y remoción de Cd y Hg en cabello por el procedimiento de digestión de Rojas.	48
Tabla VI. Variación de los tiempos de lavado con Acetona y EDTA para optimizar la determinación de Hg y Cd en muestras de cabello.	48
Tabla VII. Comparación entre receptáculos de muestras de distinto material para la determinación de Hg.	50
Tabla VIII. Concentraciones obtenidas y certificadas en los materiales de referencia	50
Tabla IX. Concentraciones obtenidas y certificadas en los materiales de referencia	51
Tabla X. Límites de detección y concentración característica para el método aplicado.	52
Tabla XI. Distribución de concentraciones de Zn, Cu, Cr, Se, Pb y Hg (mercurio total), en la población de niños con Síndrome de Espectro Autista.	55
Tabla XII. Resultados obtenidos por Adams al determinar Hg en orina de niños previamente quelados.....	59
Tabla XIII. Concentraciones de los elementos objeto de estudio, obtenidas para muestras de cabello de niños de Espectro Autista.	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación cualitativa de la respuesta de un organismo frente a la dosis de un elemento químico.....	10
Figura 2. Clasificación de los elementos químicos en los seres vivos.	10
Figura 3. Selenoproteínas en mamíferos.....	15
Figura 4. Fuente de plasma de acoplamiento inductivo (antorcha).....	22
Figura 5. Estados de la materia y procesos que sufren los átomos a lo largo de su camino a través del plasma (configuración axial).	23
Figura 6. Sistema espectroscópico del ICP-OES (configuración radial).....	24
Figura 7. Diagrama del sistema de flujo de inyección.	25
Figura 8. Espectrómetro de Emisión Atómica Thermo Jarrel Ash en funcionamiento.....	33
Figura 9. Espectrómetro de absorción atómica con generación de vapor frío, marca Perkin Elmer, modelo FIMS-100.....	35
Figura 10. Proporción de las distintas sales para la preparación de 100mL de una solución de sudor artificial.	37
Figura 11. Procedimiento desarrollado para el estudio de la adsorción de mercurio en recipientes de plástico.....	42
Figura 12. Procedimiento experimental para la digestión de las muestras de orina 24 horas.....	44
Figura 13. Procedimiento experimental para la digestión de muestras de cabello.	45
Figura 14. Absorbancias de una solución de mercurio (Hg) de 3 μ g/L en función de diferentes concentraciones de NaBH ₄	46
Figura 15. Absorbancia en función de la concentración de mercurio (Hg), con NaBH ₄ al 0,2%p/v.	47
Figura 16. Procedimiento experimental para la digestión de muestras de cabello de este estudio.....	49

Figura 17. Distribución de concentraciones de Zn, Cu, Cr, Se, Pb y Hg (Hg total), en muestras de orina 24 horas de la población de niños con Síndrome de Espectro Autista.....	54
Figura 18. Diagrama de cajas y bigotes de los datos obtenidos para muestras de orina 24 horas de niños autistas y niños sanos.	58
Figura 19. Correlaciones entre elementos en orina de niños autistas, según el coeficiente de Spearman.....	60
Figura 20. Variación de las concentraciones de Zn respecto a la concentración de Hg en muestras de orina 24 horas de niños de Espectro Autista.	61
Figura 21. Variación de las concentraciones de Se respecto a la concentración de Pb en muestras de orina 24 horas de niños de Espectro Autista.	62
Figura 22. Variación de las concentraciones de Se respecto a la concentración de Cu en muestras de orina 24 horas de niños de Espectro Autista.	63
Figura 23. Diagrama de cajas y bigotes de los datos obtenidos para muestras de orina 24 horas de niños con Síndrome de Espectro autista, según el nivel de la enfermedad.....	65
Figura 24. Diagrama de cajas y bigotes de los datos obtenidos para muestras de orina 24 horas de niños de Espectro Autista, según la dieta.	67
Figura 25. Distribución de concentraciones de Zn, Cu, Pb, Cd y Hg (mercurio total), en muestras de cabello de niños con Síndrome de Espectro Autista.	68
Figura 26. Diagrama de cajas y bigotes de los datos obtenidos para muestras de cabello de niños de Espectro Autistas y niños sanos.	71
Figura 27. Comparación de los niveles de Hg en cabello obtenidos por Adams, para niños con autismo y niños sanos.	72
Figura 28. Diagrama de cajas y bigotes obtenidos para muestras de cabello de niños con Síndrome de Espectro autista, según la severidad de la enfermedad. .	73
Figura 29. Comparación de los niveles de Hg en cabello, según la severidad de la enfermedad.....	74
Figura 30. Diagrama de cajas y bigotes de los datos obtenidos para muestras de cabello de niños de Espectro Autista, según la dieta.....	75

I. Introducción

El autismo no es una enfermedad con una causa específica, sino más bien un síndrome con 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 tal enfermedad.

Se han encontrado desórdenes metabólicos en algunos casos de autismo. Además, en los niños autistas, se presentan deficiencias en la descomposición de los péptidos (proteínas simples tales como la insulina, las endorfinas, y otros neurotransmisores) durante el proceso digestivo. Aunque no hay una causa única conocida del autismo, hay pruebas que indican que el autismo puede ser causado por una variedad de problemas: 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 y Al.

Estudios muy recientes se han ocupado de la repercusión negativa de los metales pesados en la situación del ecosistema y la salud del ser humano. 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 mercurio, oro y plomo 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.

En consecuencia, sería oportuno considerar los niveles de múltiples metales en los niños con autismo y, en función de ellos obtener argumentos que

admitan o no, la existencia de correlaciones entre la concentración metálica en el organismo de los infantes y la etiología del síndrome.

2.1 Trastornos o Síndromes del Espectro Autista

2.1.1 Aspectos generales.

Actualmente está ampliamente aceptado que los trastornos incluidos dentro del espectro del autismo, según clasificación internacional vigente, los “Trastornos generalizados del Desarrollo”, son trastornos neuro-psiquiátricos, que, presentando una amplia variedad de expresiones clínicas, son el resultado de disfunciones multifactoriales del desarrollo del sistema nervioso central.

Las personas con un trastorno generalizado del desarrollo (TGDs) presentan un conjunto particular de síntomas que afectan tres áreas o 'dominios': comunicación, socialización (interacción con los demás) y comportamiento. Esta amplia categoría comprende en la actualidad cinco diagnósticos aceptados oficialmente^[90]:

- Trastorno Autista (Autismo): trastorno del desarrollo que afecta la capacidad de la persona para comunicarse, establecer relaciones con los demás, y responder de manera apropiada al medio ambiente. Algunas personas con autismo funcionan a un nivel elevado de rendimiento, con inteligencia y lenguaje intactos. Otros pueden carecer de lenguaje verbal y/o sufrir de retraso mental.
- Síndrome de Asperger: también conocido como trastorno de Asperger, es de naturaleza neurobiológica. En contraste con el autismo, las personas con síndrome de Asperger no presentan retraso en el desarrollo del lenguaje hablado, pero pueden presentar déficits importantes en las habilidades sociales y comunicativas. A menudo presentan rutinas repetitivas y preocupaciones obsesivas sobre un asunto particular.

- 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).
- Síndrome de Rett : también conocido como trastorno de Rett, este síndrome neurológico afecta principalmente a las niñas, pero hay informes de varones que también lo presentan. De origen genético, el síndrome de Rett figura entre las causas hereditarias más comunes de discapacidad intelectual profunda y de minusvalía física en las niñas, y se presenta en más de 1 en 10.000 nacimientos femeninos. Las personas con este trastorno se desarrollan normalmente hasta los 6-18 meses de edad, y luego presentan una regresión en su desarrollo, manifestada por disminución en el crecimiento de la cabeza, pérdida de los movimientos manuales voluntarios, y luego aparición de movimientos estereotipados de las manos en la línea media. Un gen relacionado con el síndrome de Rett fue descubierto en 1999.
- Trastorno Desintegrativo Infantil: Los niños con trastorno desintegrativo infantil se desarrollan normalmente durante un período prolongado (2 a 4 años por lo general) antes de que aparezca una condición parecida al autismo. 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.

Este amplio espectro de manifestaciones clínicas, con causas orgánicas diferentes, se caracteriza por la afectación nuclear de determinadas funciones fisiológicas y neuro-psicológicas.

Prevalencia: los estudios convergen a la hora de establecer que en todo el mundo 5 de cada 10000 personas presenta un cuadro de “autismo clásico”, y de

que si se toma en consideración todo el espectro del síndrome, éste afecta aproximadamente a 1 de cada 700 ó 1000 personas. La población masculina en comparación a la femenina está sobre-representada en una proporción de 4 a 1. Se encuentra la misma proporción de casos de autismo en todas las clases sociales y en las diferentes culturas estudiadas.

Algunos estudios recientes establecen que se ha producido un gran incremento de la tasa de casos identificados. No está claro si esto representa un incremento real de la incidencia, o es un efecto de las modificaciones en los criterios diagnósticos, o el que los profesionales tengan una mayor conciencia del autismo.

2.1.2 Presentación clínica

Todos los casos presentan síntomas en las siguientes 3 áreas:

1. Alteración del desarrollo de la interacción social recíproca.

En algunas personas se da un aislamiento social significativo, otras se muestran pasivas en su interacción social, presentando un interés escaso y furtivo hacia los demás. Algunas personas pueden ser muy activas en establecer interacciones sociales, pero haciéndolo de manera extraña, unilateral e intrusa; sin considerar plenamente las reacciones de los demás. Todas tienen en común una capacidad limitada de empatía, pero son capaces, a su manera, de mostrar sus afectos.

2. Alteración de la comunicación verbal y no verbal.

Algunas personas no desarrollan ningún tipo de lenguaje, otras muestran una fluidez engañosa. Todos carecen de la habilidad de llevar a término un intercambio comunicativo recíproco. Tanto la forma como el contenido de sus competencias lingüísticas son peculiares y pueden incluir ecolalia, inversión pronominal e invención de palabras. Las reacciones emocionales a los requerimientos verbales y no verbales son inadecuadas: evitación visual,

incapacidad para entender las expresiones faciales, las posturas corporales o los gestos; en otras palabras, las conductas implicadas para establecer y regular una interacción social recíproca. En algunos casos, el desarrollo del lenguaje puede verse interrumpido o incluso retroceder.

3. Repertorio restringido de intereses y comportamientos

La actividad imaginativa resulta afectada. La gran mayoría de personas incluidas en el espectro del autismo fracasan en llevar a término el juego normal de simulación, ficción o fantasía. Esto obstaculiza y limita su capacidad de entender las emociones de los demás. En algunos casos la actividad imaginativa es excesiva. En muchos de los casos la actividad imaginativa no es efectiva como función adaptativa.

En la medida que carecen de la capacidad de desarrollar representaciones internalizadas de las intenciones de los demás, disponen de posibilidades limitadas para anticipar lo que pueda suceder, y para afrontar los acontecimientos pasados. Los modelos de conducta están a menudo ritualizados y son repetitivos. Pueden darse relaciones perseverantes de apego a objetos inusuales e insospechados. Los movimientos repetitivos y estereotipados son habituales. A menudo se da una gran resistencia al cambio y perseverancia en la inmutabilidad. Cambios insignificantes en el entorno pueden provocar un profundo malestar. Muchos niños afectados de autismo llegan a tener intereses específicos o preocupaciones sobre temas peculiares.

De todas maneras, en muchos casos se da una sensibilidad inusual hacia los estímulos -táctiles, auditivos, visuales-. Otros rasgos comunes asociados no específicos incluyen: ansiedades, trastornos del sueño y de las pautas alimentarias, trastornos gastrointestinales, crisis violentas con conducta auto lesiva. La expresión clínica puede variar mucho de uno a otro individuo, y también en un mismo individuo en el transcurso de su desarrollo. Algunos de los signos pueden ser muy intensos y dominantes en una edad y pueden fluctuar tanto en

naturaleza como en intensidad en otra, y si bien conducen a perfiles clínicos muy diferentes, sin embargo, todos son expresiones del espectro del mismo síndrome.

Además de las variaciones de expresión conductual, se da una enorme diversidad respecto al nivel de actividad mental que va desde una inteligencia normal o incluso superior, hasta un profundo retraso. Hay que tener en cuenta, sin embargo, que en las tres cuartas partes de los casos incluidos en el espectro del autismo concurre una alteración o deficiencia intelectual.

2.1.3 Causas

Una gran cantidad de evidencias científicas coinciden en que los síntomas de los trastornos del espectro del autismo son el resultado de alteraciones generalizadas del desarrollo de diversas funciones del sistema nervioso central. La causa, o causas, está aún por dilucidar. Está claro que no se trata de una causa biológica única, sino que hay que considerar una etiología multifactorial. En la mayoría de los casos, se establecen correlaciones con factores hereditarios junto con una contribución genética compleja y pluridimensional que daría lugar a una gran variación en la expresión de las conductas.^[89]

Sin embargo, sólo con los genes no se pueden explicar todas las variaciones que se dan en las desviaciones muy precoces. Debe tenerse en cuenta la interacción entre el potencial genético y el entorno biológico a nivel pre y perinatal.^[90]

En otros casos, existe una gran relación entre los trastornos del espectro del autismo y algunas patologías genéticas -fenilcetonuria, esclerosis tuberosa, neurofibromatosis, X frágil-. Actualmente, en el autismo, es aplastante la evidencia de un mecanismo causal biológico y orgánico. Se ha demostrado, más allá de cualquier duda razonable, que no hay ninguna relación causal entre las actitudes y las acciones de los padres y el desarrollo de los trastornos del espectro del autismo.^[90]

La expresión clínica hay que considerarla como el resultado de la interacción entre la constitución del individuo -predisposición biológica- y un número de factores internos y externos que pueden interactuar de manera favorable protegiendo del riesgo, o de manera desfavorable acentuando el riesgo y la subsiguiente expresión clínica. Pueden actuar como factores protectores: un coeficiente intelectual -CI- alto, el desarrollo del lenguaje y del habla, un temperamento agradable, el éxito en las intervenciones educativas del desarrollo, y un entorno social protector que pueda afrontar la múltiple problemática y, al mismo tiempo, favorecer un desarrollo sano.

A la inversa, los factores de riesgo incluyen: un coeficiente intelectual -CI- bajo, ausencia de lenguaje o de habla, deficiencias neurológicas, ausencia de programas educativos en la primera edad, y un entorno social incapaz de prestar apoyo y afrontar la tremenda presión causada por la presencia de un niño afectado por el trastorno del espectro del autismo.

Asimismo, se presume que agentes externos como la contaminación, factores nutricionales e incluso, intoxicación por metales incluidos dentro de los elementos biogénicos, pueden aumentar el riesgo de padecer autismo.

2.2 Los Elementos Biogénicos

Un elevado número de elementos químicos forman parte de los seres vivos y son conocidos como elementos Biogénicos o Bioelementos. Se pueden clasificar de acuerdo a su abundancia en: Bioelementos principales, secundarios y elementos traza. Los Bioelementos principales, llamados también elementos mayoritarios, constituyen el 95% de la masa total de los seres vivos, éstos son: C, H, O y N. Por su parte, los bioelementos secundarios representan el 4,5% de la materia viva y los elementos traza, menos del 0,01%. ^[1]

La importancia de la presencia de los elementos químicos en el organismo humano, en especial los elementos traza, radica en que algunos de éstos, regulan

las actividades de muchas enzimas y proteínas, actúan como biocatalizadores que permiten la transformación química de grandes cantidades de sustratos a partir de los cuales se producen los diferentes componentes necesarios para llevar a cabo todos los procesos vitales.^[2]

Por otra parte, los elementos químicos presentes en los seres vivos pueden ser esenciales y no esenciales. Para que uno de éstos sea considerado esencial debe cumplir con las siguientes condiciones: i) Estar presente en los tejidos sanos. ii) Su concentración en los tejidos de una misma especie debe ser relativamente constante. iii) La ingesta insuficiente del elemento debe provocar deficiencias funcionales, alteraciones ultraestructurales y fisiológicas en algunos casos reversibles cuando éste vuelve a estar en las concentraciones adecuadas. iv) Tiene que influir directamente en el organismo y estar involucrado en sus procesos metabólicos.^[1,2]

Es importante señalar que cualquier elemento químico, sea esencial o no, puede ser tóxico a partir de unos determinados niveles. Existe un intervalo de concentraciones considerado óptimo dentro del cual se alcanza un valor que le permite al elemento desempeñar correctamente las funciones biológicas en un organismo (ver figura 1). Por debajo o encima de este rango se produce la deficiencia o toxicidad respectivamente, lo que conlleva a la aparición de efectos patológicos o incluso la muerte.

Los niveles óptimos de un elemento químico se mantienen en un organismo mediante mecanismos homeostáticos. De esta forma se controla la absorción, almacenamiento y excreción del mismo. Sin embargo, se puede producir déficit o exceso debido a la dieta, problemas en los mecanismos de absorción, entre otros.

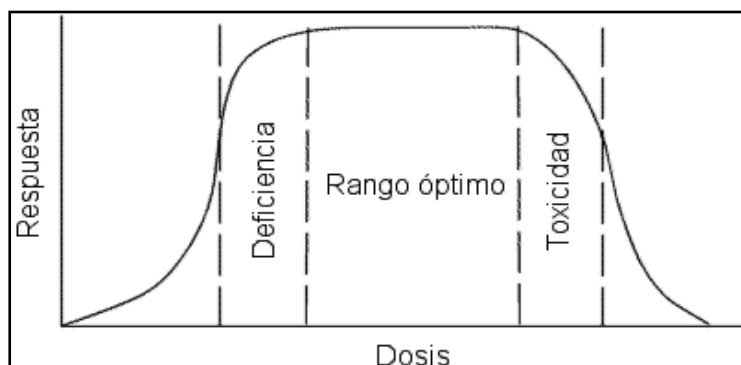


Figura 1. Representación cualitativa de la respuesta de un organismo frente a la dosis de un elemento químico.

Seguidamente, en la figura 2, se presenta un esquema que ilustra la clasificación de los elementos químicos en los seres vivos.

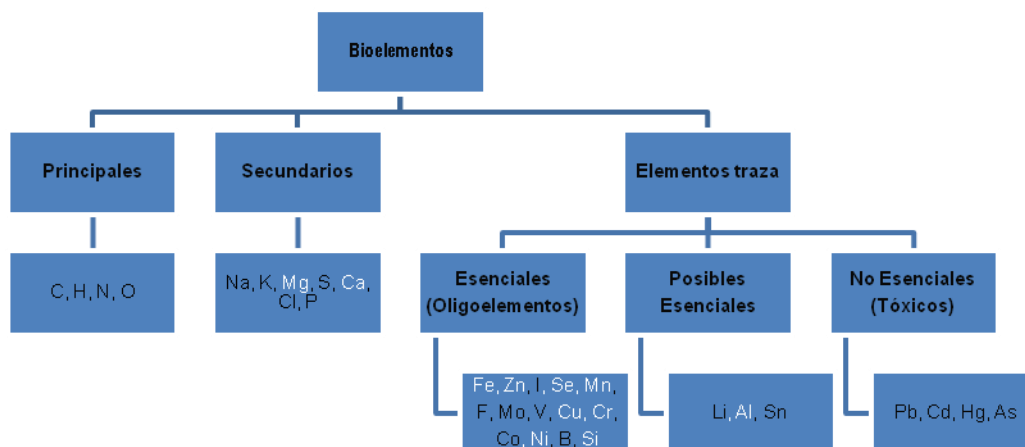


Figura 2. Clasificación de los elementos químicos en los seres vivos.

Finalmente, algunas características y funciones de los elementos químicos en los organismos vivos, especialmente, los bioelementos secundarios y elementos traza son presentadas a continuación.

2.2.1 Bioelementos secundarios

Los bioelementos secundarios son conocidos también como macrominerales o elementos en masa, existen típicamente en estado iónico en los alimentos y en el cuerpo humano. ^[1] A este grupo pertenecen: P, Mg, Ca, S, Na,

Cl y K; Entre las funciones y consecuencias de las deficiencias de algunos de estos elementos en el organismo se encuentran:

- a. Magnesio:** El magnesio iónico (Mg^{2+}), es un cofactor para más de 300 enzimas que intervienen en el metabolismo de los componentes de los alimentos. Entre las reacciones que lo requieren están la síntesis de ácidos grasos y proteínas. También desempeña una función en la transmisión y actividad neuromuscular. En la contracción muscular normal, el calcio hace las veces de un estimulador y el magnesio actúa como un relajador. Este elemento opera como bloqueador de los canales del calcio fisiológico. Se ha notificado en individuos con deficiencia, trastornos como irritabilidad, espasmos musculares, convulsiones, estados de coma y alteraciones en la secreción de hormona paratiroidea. ^[2]
- b. Calcio:** El calcio iónico (Ca^{2+}), en líquidos corporales participa en el transporte de iones a través de las membranas de organelos celulares, además, constituye el 99% de huesos y dientes; el resto participa en los procesos de coagulación de la sangre, contracción muscular, transmisión nerviosa y regulación de la función del músculo cardíaco. Su deficiencia es uno de los factores que intervienen en el desarrollo de la osteoporosis en una etapa de la vida. ^[2]
- c. Potasio:** El ion (K^+) funciona en la regulación del pH fisiológico. Es necesario para el metabolismo de los carbohidratos y las proteínas. La deficiencia se ha relacionado con la hipertensión, dolores de cabeza, irritabilidad y taquicardias. ^[2, 3,4]

2.2.2 Elementos traza

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.^[1]

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^[2]. Algunas de las funciones, consecuencias de las deficiencias en el organismo humano y síntomas asociados con la toxicidad (cuando sus concentraciones exceden determinados límites) de algunos de estos oligoelementos son presentadas a continuación:

- a. **Hierro:** (Fe^{2+} , Fe^{3+}); alrededor del 70% se encuentra en la hemoglobina y la mioglobina. El hierro de la hemoglobina se coordina con el oxígeno y lo transporta a través de la sangre a los órganos del cuerpo, además, es componente esencial de algunas proteínas como los citocromos. La deficiencia puede relacionarse en algunos casos con hemorragias excesivas y producir la anemia como resultado de niveles bajos de hemoglobina en la sangre. Entre los síntomas de la anemia se encuentran el cansancio, falta de energía, insomnio, pérdida del apetito y palidez. Todos éstos se asocian con un aporte disminuido de oxígeno a los tejidos y a los órganos. El hierro también desempeña una función inmune, las personas con niveles bajos de este elemento presentan una resistencia menor ante las infecciones. Otra deficiencia se relaciona con el funcionamiento cerebral disminuido, en los niños puede resultar en

problemas con la capacidad de aprendizaje y el comportamiento. Los síntomas de toxicidad incluyen la fatiga, la pérdida de peso, dolores de cabeza, dificultad de respirar y vértigo. ^[2,4]

b. Cobre: (Cu^+ , Cu^{2+}); componente de la sangre, de las enzimas y varias proteínas; protege contra oxidantes y radicales libres; favorece la síntesis de melanina y juega un papel importante en la oxidación del hierro antes de transportarlo en el plasma; desempeña funciones en la producción de energía de las mitocondrias. Las manifestaciones clínicas de su deficiencia son: la anemia, anormalidades esqueléticas, despigmentación del cabello; muchas de ellas son atribuidas a fallas enzimáticas. Las personas con niveles altos de cobre a menudo presentan una variedad de síntomas como la fatiga, el nerviosismo, la depresión, la irritabilidad, cansancio, problemas de comportamiento, dificultades de aprendizaje y enfermedades mentales, es posible que se desarrolle la cirrosis hepática. ^[2,3,4]

c. Cromo: En el organismo el Cr^{+3} tiene acción sobre la insulina (hormona producida en el páncreas que controla el nivel de azúcar en la sangre). Generalmente, no se encuentra en forma iónica libre, sino que está formando parte de un complejo ácido dinicotínico-glutation denominado Factor de Tolerancia a la Glucosa (FTG), el cual, ha demostrado aumentar los efectos estimulantes de la insulina. Se cree que este elemento participa en el proceso de fijación de la insulina mediante la formación de un puente entre la molécula de esta sustancia y la membrana celular. También, participa en la síntesis de aminoácidos y controla los niveles de colesterol en la sangre. La deficiencia altera el metabolismo de los azúcares, aminoácidos y produce el incremento de las grasas en la sangre. La toxicidad del Cr^{+3} se encuentra bajo estudio. Por otra parte, los compuestos de Cr^{+6} son muy oxidantes y tienen propiedades carcinógenas. El hecho de que el Cr^{+6} sea perjudicial para el organismo es que una vez que ingresa

tiende a reducirse en su forma estable que es Cr^{+3} degenerando las células y provocando diferentes tipos de cáncer. [2,3,4]

d. Cobalto: (Co^{2+}); el ion libre se coordina a ciertas enzimas y existe en forma de complejo como constituyente de la vitamina B_{12} ; esencial para la función de todas las células, sobre todo las de la médula ósea, los sistemas nervioso y gastrointestinal. La deficiencia de cobalto está relacionada con la vitamina B_{12} , lo cual produce, anemia macrocítica. Un alto consumo de cobalto inorgánico puede provocar reticulocitosis y un aumento del volumen sanguíneo. [2,3,4]

e. Selenio: (Se^{+4} , Se^{+6}); Interviene en el metabolismo de la vitamina E y forma parte de diversas enzimas llamadas selenoproteínas (ver figura 3). La actividad biológica más importante de este elemento es a través de la enzima Glutation peroxidasa (GSH-Px) que se reconoce generalmente por su función antioxidante. También, las selenoproteínas de la Iodotironina Deiodinasa (ID) en sus diferentes tipos: ID I, ID II, ID III, son capaces de convertir la hormona T_4 (tetrayodotironina o tiroxina) en T_3 (triyodotironina). Es rara su deficiencia en el ser humano; Los consumos deficientes contribuyen a la carcinogénesis. Se ha demostrado que los enfermos con algunos tipos de cáncer tienen bajas concentraciones plasmáticas de este elemento. Los signos de toxicidad consisten en cambios cutáneos, caries dental, anormalidades neurológicas, entre otras. [2,3,4]

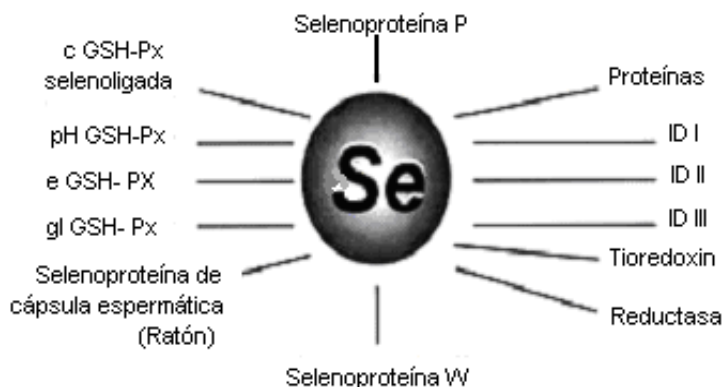


Figura 3. Selenoproteínas en mamíferos.

- f. **Zinc:** (Zn^{2+}); Las funciones bioquímicas del zinc son muy variadas. Es un componente esencial de más de 300 metaloenzimas que participan en las vías metabólicas principales. En las metaloenzimas, el zinc habitualmente se localiza y actúa a nivel del sitio catalítico activo, aunque también puede desempeñar funciones estructurales y/o reguladoras, en cualquiera de los casos forma un complejo con las proteínas o con las apoenzimas al combinarse con sus átomos ricos en electrones, como el oxígeno, el nitrógeno y el azufre. Éste elemento juega un importante papel en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN), del ácido ribonucleico (ARN) y las proteínas. Es esencial para el normal crecimiento y desarrollo de las especies. Interviene en los procesos de cicatrización, de expresión de información genética, en la síntesis del colágeno y en el almacenamiento de insulina en las células β del páncreas. Además, participa en los procesos de transporte y de inmunidad celular. La deficiencia produce defectos inmunitarios, retardo en la cicatrización de las heridas, del crecimiento y maduración sexual. También, lesiones cutáneas, alteraciones en el apetito y el gusto. La suplementación por encima de los valores recomendados interfiere en la absorción del cobre. Los síntomas de toxicidad en algunos casos son: la anemia, fiebre y alteraciones del sistema nervioso central. [1,2,3,4]

g. Manganese: (Mn^{2+}); componente de las enzimas, entre la que se encuentra la dismutasa de superóxido de las mitocondrias. El manganeso se relaciona con la formación de tejidos conjuntivos esqueléticos, el crecimiento, la reproducción, el metabolismo de carbohidratos y lípidos. No se ha comunicado alguna evidencia fisiológica por motivo de su deficiencia y los datos que resultan, están confinados a los resultados de estudios en animales. Mahan y Scout-Stump^[2], dicen que se ha presentado intoxicación por manganeso en mineros debido a su absorción a través del sistema respiratorio, el exceso se acumula en el hígado y en el sistema nervioso central, produce síntomas parecidos a los de la enfermedad de Parkinson.

Es importante señalar que algunos elementos traza presentes en el organismo poseen esencialidad incierta, por lo tanto, sus funciones y requerimientos se encuentran indefinidos en virtud de los papeles a saber en el funcionamiento del cuerpo humano. Entre ellos se encuentran: Li, Al y Sn. ^[2]

Asimismo, 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. A continuación se presentan algunos de sus efectos sobre la salud por intoxicación:

1. Plomo: Afecta los nervios interfiriendo en la producción energética y el lanzamiento de neurotransmisores. La toxicidad aguda del plomo conduce a la encefalopatía. La exposición de plomo crónica puede dar lugar a problemas de aprendizaje, especialmente en los niños, puede entrar en el feto a través de la placenta de la madre. Debido a esto, puede causar serios daños al sistema nervioso y al cerebro de los niños por nacer. El peligro potencial del plomo continuará siendo un problema. ^[4]

- 2. Mercurio:** La toxicidad del mercurio depende de su forma química y, por lo tanto, los síntomas y signos varían según se trate de exposición al mercurio elemental, a los compuestos inorgánicos de mercurio, o a los compuestos orgánicos de mercurio (en particular los compuestos de alquilmercurio como sales de metilmercurio, etilmercurio y el dimetilmercurio). El mercurio tiene un número de efectos sobre los humanos, que pueden ser simplificados en los siguientes: afecta al sistema nervioso, ADN y cromosomas, efectos negativos en la reproducción. El exceso de mercurio en el cuerpo puede dañar el hígado, riñones, páncreas, médula, así como agravar la hipertensión y diabetes.^[4]
- 3. Cadmio:** El Cadmio se acumula en los riñones, donde causa un daño en el mecanismo de filtración. Esto causa la excreción de proteínas esenciales y azúcares del cuerpo y el consecuente daño de los riñones. Lleva bastante tiempo antes de que el cadmio que ha sido acumulado en los riñones sea excretado del cuerpo humano. Otros efectos sobre la salud que pueden ser causados son: enfisemas, bronquitis crónica, deterioro del sistema nervioso central, el sistema inmune y desarrollo del cáncer.^[4]

2.2.2.1 Interacciones entre elementos traza.

Existe un creciente interés en la determinación de elementos traza esenciales o tóxicos en especímenes biológicos por su relación con la salud, la nutrición y la toxicología^[13]. Los metales pesados alteran el metabolismo y las funciones de ciertos elementos traza como el hierro, el cobre y el zinc, al competir por los mismos ligandos en ciertos sistemas biológicos^{[14][15]}. Por otra parte, se indica al estado nutricional como modificador del metabolismo y la toxicidad de los metales pesados^[16]. De hecho, estudios en animales demuestran que ciertos elementos esenciales, como el zinc, el hierro, el selenio y el cobre, especialmente a elevadas concentraciones, pueden interaccionar con los efectos del plomo y

otros metales^[17]. Así, las tasas elevadas de plomo producen el desplazamiento del cobre y zinc de los tejidos^[18].

Uno de los mecanismos por los cuales se produce una interacción entre elementos traza es la competición, en el tracto gastrointestinal, por proteínas que afectan a la absorción. Así, la velocidad de absorción de cadmio está aumentada cuando existe deficiencia de ciertos elementos con un mecanismo de transporte común^[19], los suplementos de Zn que superan en 10 veces a los ingresos diarios recomendados (15 a 20 mg/día) producen un déficit condicionado de cobre acompañado de anemia^[20], o las dietas pobres en selenio o zinc pueden dar lugar a una mayor absorción de plomo^[21]. Se considera que la metalotioneína (MT) intestinal interviene en este efecto^{[22][23]}.

Además, los elementos tienen en común la afinidad por la MT^{[24][25]}, teniendo en común, por lo tanto, un importante mecanismo de transporte, como por ejemplo en el caso del cadmio^{[26][22]} o del mercurio^[27], almacenamiento e, incluso, de protección frente a los efectos tóxicos de los mismos. En la bibliografía se citan efectos protectores para el cadmio^{[28][29][24][30]}, el cobre^[29] y el mercurio^[249], entre otros.

El hecho de que la síntesis de metalotioneína (MT) se encuentre inducida por los metales esenciales Cu^{[31][32]} y Zn^{[23][31][32]}, así como por los metales tóxicos cadmio^{[31][32][29]} y mercurio^{[33][31][32]}, explica el efecto protector de unos elementos sobre otros, como sucede con el zinc en el caso del cadmio^[34] o en el caso del mercurio^[35].

La interacción entre el mercurio y otros elementos, en particular el selenio, ha sido de gran interés en las últimas décadas. El selenio puede interaccionar en el organismo con una serie de metales tóxicos (As, Cd, Hg, Cu, Ag, Pb, etc.), impidiendo el daño de éstos en diferentes tejidos^{[1][21]}. La reducción de la toxicidad del mercurio por parte del selenio ha sido observada por diversos autores por

estudios, tanto en animales como en el hombre. Sin la necesidad de suplementos de selenio, el selenio procedente de la alimentación es capaz de reducir la toxicidad crónica del metilmercurio^[36].

El mecanismo por el cual el selenio ejerce una cierta protección contra la toxicidad del mercurio es desconocido (OMS, 1987), pero el hecho de que la vitamina E y otros antioxidantes tengan el mismo efecto protector ha planteado la hipótesis de que actúan sobre los radicales libres producidos en la acción del mercurio^[37]. Se han propuesto tres mecanismos de actuación:^[1].

1. Formación de complejos insolubles y estables con estos metales.
2. Unión a proteínas de bajo peso molecular y junto al metal, formar proteínas de gran tamaño que no atraviesen la membrana celular.
3. Interfiriendo en el metabolismo de dichos metales.

La acción protectora del ión selenio en el caso del metilmercurio no implica un aumento en la excreción de mercurio, sino que origina una alteración en su distribución con incremento de la concentración de mercurio en el cerebro^[38] lo que sugiere que el efecto sobre la distribución del mercurio se realiza por medio de un mecanismo tisular específico, más que por un mecanismo general que afecte a todos los tejidos por igual^[39]. En el hombre expuesto de manera crónica al mercurio (inorgánico u orgánico) se observa una acumulación paralela de selenio y mercurio en riñón y el resto de los tejidos.

El estudio de los comportamientos descritos en párrafos previos, han sido desarrollados a través del empleo de diferentes técnicas analíticas, cuya aplicación depende de lo que se desea determinar, así como también del grado de sensibilidad y rigurosidad requerida.

2.3 Técnicas analíticas empleadas para la determinación de metales en niños de Espectro Autista.

Para la determinación del contenido metálico en niños autista en indicadores biológico como cabello y orina, han sido sumamente importantes los avances que se han producido para diversas técnicas analíticas. En el caso de la espectroscopía de absorción atómica con atomización de llama (FAAS) en 1928 y la espectroscopía de absorción atómica con atomización electrotérmica o de horno de grafito, en 1959 (ETAAS), el límite de cuantificación mejoró desde partes por cien (pph) o gramos por litro, a partes por millón (ppm) o miligramos por litro y, finalmente, a partes por billón (ppb) o microgramos por litro.” [47].

“Para reducir las interferencias producidas por la matriz o medio en el que se encuentra el analito, se han utilizado diferentes técnicas de digestión, dentro de las que están incluidas la digestión por vías húmeda y por vía seca, para analizar suero, sangre, orina y otros especímenes. Sin embargo, la adición de esta etapa de digestión puede introducir errores considerables, por lo que la aparición de la corrección de fondo por efecto Zeeman introdujo la posibilidad de analizar directamente las muestras clínicas, a excepción de los tejidos, sin una previa digestión.” [47].

“En los años setenta y ochenta aparecieron técnicas como la activación de neutrones o el plasma acoplado inductivamente (ICP) y, finalmente, la tecnología de punta del plasma acoplado inductivamente acoplada a la espectrometría de masas (ICP-MS) que permite cuantificar los elementos traza a niveles de partes por trillón (ppt) o nanogramos por litro (ng/L).” [47].

“Con el uso de estas técnicas se han descrito enfermedades asociadas a los elementos traza como la encefalopatía dialítica, en el caso del aluminio, la enfermedad de Wilson, en el caso del cobre, que han provocado que se

establezcan unos intervalos de concentración aceptables para los distintos elementos traza.” [47].

Tabla I. Diferentes características de las principales técnicas analíticas utilizadas para la determinación de elementos traza^[47].

Característica	FAAS	ETAAS	ICP	ICP-MS
Linealidad	2 – 3	2 -3	5 - 6	5 - 6
Patrón interno	No	No	Si	Si
Detección multielemental simultánea	No	No	Si	Si
Interferencia de fondo	Si	Si	Baja	Baja
Límite de detección	ppm	ppb	ppm - ppb	ppb - ppt

Para este estudio en particular, se trabajó con el espectrofotómetro de absorción atómica con generación de vapor frío (CV-AAS) para la determinación de mercurio y, el espectrómetro de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES) para elementos como zinc, cobre, cromo, selenio cadmio y plomo, cuyas técnicas son descritas ampliamente en secciones posteriores de este trabajo.

2.3.1 Plasma óptico inductivamente acoplado (ICP-OES).

Por definición, un plasma es una mezcla gaseosa conductora de la electricidad que contiene una concentración significativa de cationes y electrones (la concentración es tal que la carga neta se aproxime a cero). El origen de la emisión continua proviene aparentemente de la recombinación de los electrones con el argón y otros iones.

En el plasma de argón empleado frecuentemente en los análisis de emisión, los iones de argón y los electrones son las principales especies conductoras, aunque los cationes de la muestra también estén presentes en menor cantidad. Una vez que se han formado los iones de argón en un plasma, son capaces de absorber la suficiente energía de una fuente externa como para mantener la

temperatura a un nivel tal que la posterior ionización sustente el plasma indefinidamente; la temperatura puede llegar a ser de 10000 °K en el núcleo. [47]

Un plasma característico tiene un núcleo no transparente, blanco brillante y muy intenso, coronado por una cola en forma de llama. Las observaciones espectrales por lo general se hacen a una altura de 15 a 20 mm por encima de la bobina de inducción. En esta zona la radiación de fondo está libre de las líneas del argón y resulta adecuada para el análisis. [47]

2.3.1.1 Fuente de plasma de acoplamiento inductivo (ICP, Inductively Coupled Plasma)

El equipo de ICP OES utiliza una fuente de plasma de acoplamiento inductivo para dissociar los átomos o iones que constituyen la muestra, excitándolos a un nivel de energía de donde emiten luz al relajarse con una longitud de onda característica. La fuente de plasma de acoplamiento inductivo se denomina antorcha (ver figura 4). Consiste en tres tubos concéntricos de cuarzo a través de los cuales fluyen tres corrientes de argón. El diámetro del tubo más grande es de

aproximadamente 2,5 cm. Rodeando la parte superior de este tubo se encuentra una bobina de inducción, refrigerada por agua, que está alimentada por un generador de radiofrecuencia, capaz de producir una potencia de 0,5 a 2 KW a unos 27 o 41 MHz.

La ionización del argón que fluye se inicia por medio de una chispa que proviene de una bobina Tesla. Los iones resultantes y sus electrones asociados

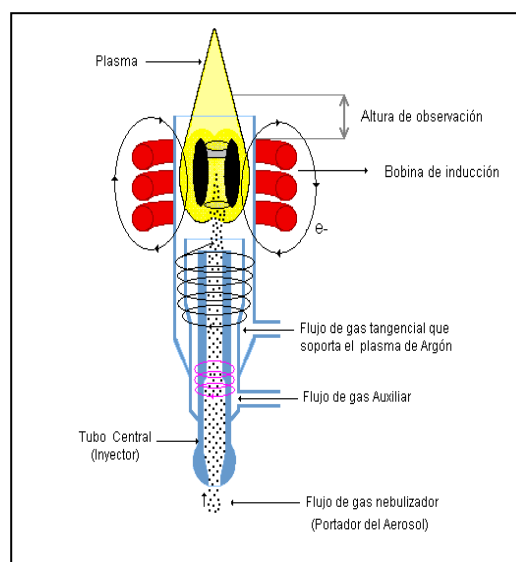


Figura 4. Fuente de plasma de acoplamiento inductivo (antorcha).

interaccionan entonces con el campo magnético oscilante producido por la bobina de inducción. Esta interacción hace que los iones y los electrones dentro de la bobina se muevan en trayectorias circulares. Las temperaturas alcanzadas son debidas al calentamiento óhmico que surge como consecuencia de la resistencia que presentan los iones y electrones a este movimiento. [47,48]

Estos electrones ionizan el gas plasmógeno que se inyecta tangencialmente formando un patrón en remolino y es el responsable de sostener la descarga, además, enfría las paredes del tubo central. Otro gas también es inyectado y es llamado gas auxiliar, su función es estabilizar el flujo hidrodinámico en la antorcha y centra al plasma. [30,31] Las muestras disueltas son transformadas en un aerosol de partículas finas por los nebulizadores, los cuales se acoplan al sistema de generación del plasma. El aerosol se introduce dentro de la antorcha mediante un flujo de argón de 0,3 a 1,5 L/min llamado flujo de gas nebulizador. [47,48]

El proceso de excitación se inicia cuando la energía de la fuente ICP es transferida hacia el canal central a lo largo del cual se introduce la muestra a analizar, una vez allí comienza a sufrir un proceso secuencial de desolvatación, vaporización, atomización, excitación e ionización (ver figura 5).

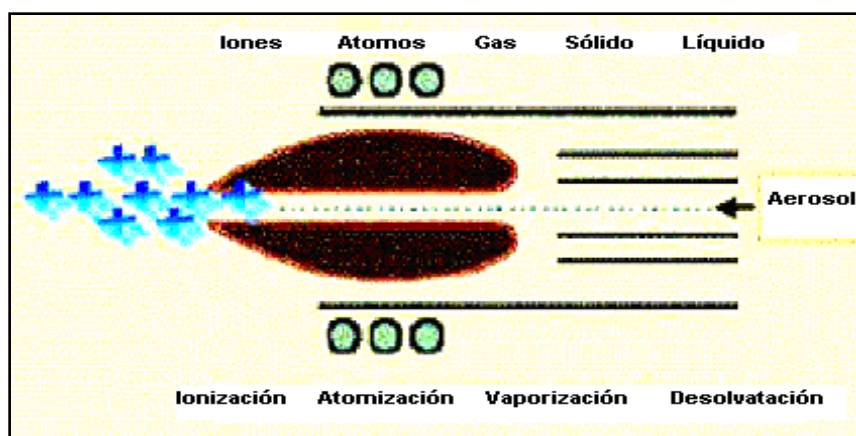


Figura 5. Estados de la materia y procesos que sufren los átomos a lo largo de su camino a través del plasma (configuración axial).

Posteriormente, la luz emitida por los átomos excitados e ionizados presentes en la muestras es colectada por un sistema óptico. Éste enfoca la luz hacia un detector que transforma la energía electromagnética en una señal eléctrica que es amplificada, registrada y expuesta para ser leída. En la figura 6, se presenta un esquema del instrumento de ICP OES. Finalmente, hay que destacar que existe la posibilidad de analizar directamente muestras sólidas y gaseosas empleando la técnica de ICP OES. Para introducir las muestras sólidas

se utilizan procedimientos como los de vaporización electrotérmica y ablación por láser. [47] Las gaseosas se analizan por acoplamiento con cromatografía de gases o generación

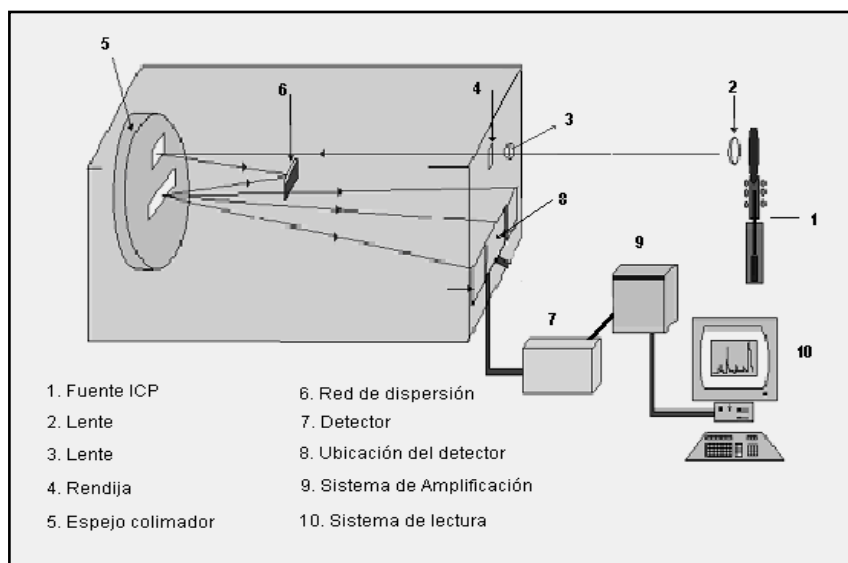


Figura 6. Sistema espectroscópico del ICP-OES (configuración radial).

de hidruros.

2.3.2 Espectrofotómetro 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^[107]. 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 Hg^{+2} por tratamiento de las muestras con una mezcla oxidante de ácidos nítrico y sulfúrico, seguido de la reducción del Hg^{+2} al metal (Hg^0), normalmente volátil, con un

NaBH₄, en un sistema cerrado, como se indica en la figura 7, 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^[108].

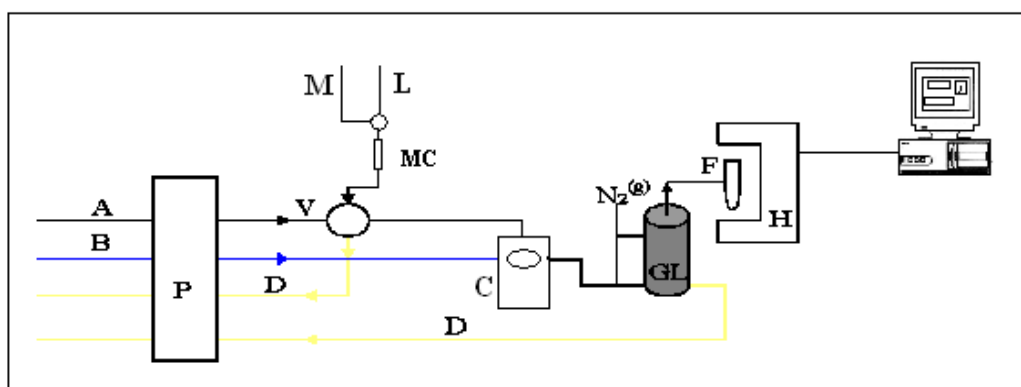


Figura 7. Diagrama del sistema de flujo de inyección. A, solución acida transportadora; B, agente reductor; c, reactor; D, Desechos; GL, separador gas/líquido; F, Celda de atomización (cuarzo); H, espectrómetro de absorción atómica; V, válvula de inyección; P, bomba peristáltica; M, Muestra; MC, micro-columna; L, solución eluyente

2.4 Estudios sobre la incidencia de los metales pesados en la aparición del Síndrome del Espectro Autista.

Son muchos los estudios que se han realizado con la finalidad de establecer relaciones metal-autismo, sobre todo en el caso del mercurio. Sin embargo, en esta sección, se presenta un resumen de los trabajos más recientes relacionados con esta investigación:

- Lathe, R. (2006)^[91], 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.

- Palmer, R. (2006)^[92], 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.
- Adams, J., et. al. (2003)^[93], 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.

- Adams, J., et. al (2003)^[94], 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.

- Holmes, A., et. al. (2003)^[100], 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^a 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.

III. Objetivos

3.1 Justificación.

En los últimos años, se ha incrementado el número de estudios sobre el autismo, debido principalmente a un incremento significativo de las tasas de individuos afectados. Se considera que aproximadamente uno de cada 150 niños presenta algún nivel del Síndrome de Espectro Autista.

No se conocen las causas que lo originan, pero se cree que su origen está asociado a factores genéticos predeterminados por la influencia multifactorial de desórdenes gastrointestinales, un sistema inmune deficiente y/o la contaminación ambiental^{[89][90]}. Debido a esto, 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.

En Venezuela, son pocos los análisis de elementos trazas que se han realizado en muestras biológicas de personas con autismo. La mayoría de las investigaciones se enfocan en el papel del mercurio en bioindicadores como sangre y orina. Esta situación, ha conllevado a muchos médicos, a buscar alternativas que le suministren mayor información sobre el contenido metálico en el cuerpo de los niños de Espectro Autista.

Hoy en día, uno de los exámenes utilizados por los médicos venezolanos, es la determinación del contenido de elementos traza en cabello. Estos estudios, además de ser onerosos, son realizados en laboratorios extranjeros como Doctor's Data, Inc y Trace Elements, Inc. Tal situación, implica además de una mayor inversión, la ausencia de bases de datos relacionadas a la carga metálica de niños autistas venezolanos, que permitan estudiar a fondo la existencia o ausencia de relaciones metal-autismo.

Adicionalmente a esto, son muchas las opiniones encontradas respecto a la utilidad de este tipo de análisis. En el caso del cabello, el Dr. Dan Pascual, investigador químico en los CDC (Centers for Disease Control and Prevention), hace hincapié en que el cabello tiene ventajas reales en que: (1) puede contener niveles relativamente altos de sustancias peligrosas de potencial interés, incluidos los elementos y algunos compuestos orgánicos, (2) no es un método invasivo, y (3) se trata de un modelo estable. También asevera que algunas de las limitaciones son: 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 fidedignos^[102].

Por tal motivo, surge la necesidad de realizar investigaciones más amplias que permitan determinar la utilidad de indicadores biológicos como cabello y orina, para proporcionar a los galenos venezolanos análisis más precisos; estableciéndose así relaciones ciencia – salud y/o ciencia -sociedad. Dado que el autismo no distingue entre clases sociales y, que son muchos los padres de escasos recursos económicos que no pueden costear este tipo de análisis.

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.

3.2 Objetivo general.

Determinar el 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 de espectroscopia atómica.

3.3 Objetivos específicos.

- Optimizar las metodologías de análisis para la determinación de elementos traza en cabello y orina, a través de técnicas de espectroscopia atómica.
- Determinar las concentraciones de los metales esenciales: Zn, Cu, Cr, Se y no esenciales: Hg, Pb, Cd, en cabello y orina de niños de espectro autista, a través de técnicas de espectroscopia atómica.
- Comparar el contenido de los elementos traza en niños autistas con el de un grupo control.
- 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.

4.1 Equipo

4.1.1 Espectrómetro de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES).

Para la determinación de los elementos trazas en las muestras de cabello y orina, se utilizó un espectrómetro de emisión atómica con plasma inductivamente acoplado de argón con detección simultánea marca Thermo Jarrel Ash, modelo IRIS-HR, vista radial, de detección simultánea, que se muestra en la figura 8.



Figura 8. Espectrómetro de Emisión Atómica Thermo Jarrel Ash en funcionamiento.

La tabla II presenta las condiciones de trabajo empleadas, las cuales fueron optimizadas en trabajos previos. [97]

Tabla II. 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	0,4 L/min
Aspiración de muestra	1,14 mL/min
Flujo de gas auxiliar	1,5 L/min
λ_{trabajo} (nm)	Zn(II)202,5; Cu(I)219,9; Cr(II)283,6; Se(I);196,1 Pb(II)220,3; Cd(I)226,5;

λ : longitud de onda de trabajo

nm: nanómetros

El equipo consta de los siguientes componentes: un generador de radiofrecuencia (RF). el cual opera a una frecuencia de 27,12 MHz; una antorcha o quemador del tipo desmontable, fabricada de cuarzo, circundada por tres espiras de cobre de 4,0 mm de diámetro externo, refrigeradas por agua. El sistema óptico está constituido por un monocromador de dispersión cruzada, provisto de una red de echelle de dispersión cruzada de 62 líneas/mm, una distancia focal de 381mm y un prisma; este arreglo permite obtener un espectro en dos dimensiones. El detector que utiliza el equipo es el de inyección de carga (CID, Charge Injection Detector), en estado sólido, el cual permite una detección simultánea. Está fabricado en silicio y opera a unas bajas temperaturas de -70 °C mediante argón que circula en una unidad refrigerante.

4.1.2 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 9), 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.

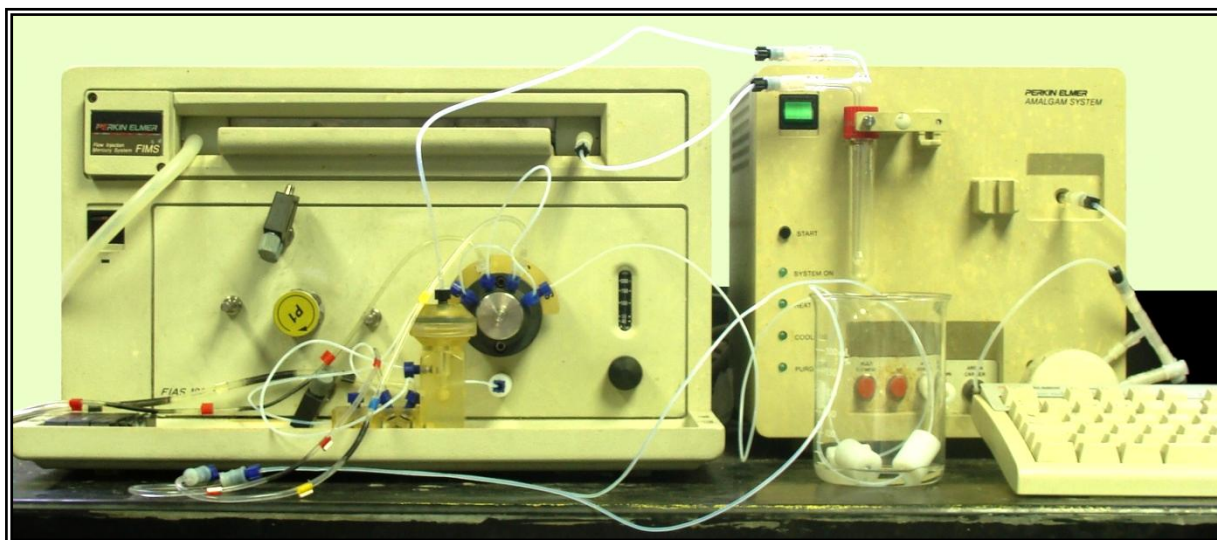


Figura 9. Espectrómetro de absorción atómica con generación de vapor frío, marca Perkin Elmer, modelo FIMS-100.

La tabla III, presenta las condiciones óptimas de seleccionadas para la determinación de Hg en las muestras.

Tabla III. Condiciones de operación para el CV-AAS.

Parámetros	Valor
Longitud de onda (λ)	253,7 nm
[NaBH ₄]concentración	0,2% m/v
[HCl]concentración	5% p/v
Flujo de reductor	5mL7min
Flujo de ácido transportador (HCl)	9mL/min

Para la digestión de muestras y material certificado, se empleó un baño de ultrasonido de la casa Cole Parmer, modelo 8894 con porta muestra circular semigiratoria.

4.2 Soluciones y reactivos

Para la digestión de las muestras de cabello se empleó acetona al 99,5%, HNO_3 al 65% p/p, tetradestilado en un destilador de teflón a temperatura por debajo del punto de ebullición, así como también H_2O_2 al 30%p/p, todos de la casa Riedel de Haen. Además, se utilizó la sal di-sódica de EDTA al 99% de pureza, marca Merck. El HNO_3 también fue utilizado para la acidificación de los patrones.

La preparación de los patrones multielementales utilizados para la construcción de las curvas de calibración en ICP-OES, se llevó a cabo empleando estándares de Zn, Cu, Cr, Se, Pb y Cd de 1000 mg/L al 2% de HNO_3 cada uno, de la casa Merck. En el caso del Hg, se prepararon patrones para la elaboración de curvas de calibración por CV-AAS, partiendo de un estándar de 1000mg/L al 2% HNO_3 , marca High-purity Standard; estos fueron acidificados con los ácidos nítrico y sulfúrico (HNO_3 tetradestilado y H_2SO_4)

Para el tratamiento de las muestras de orina se utilizó HNO_3 al 65% p/p tetradestilado, H_2SO_4 al 98% p/p, ambos de la marca Riedel-de-Haën, KMnO_4 al 99,1% p/p marca J.T. Baker. Adicionalmente, se usó para la determinación de Hg, NaBH_4 al 95% p/p marca Riedel-de-Haën, como agente reductor y HCl al 99% p/p de la casa Merck, como ácido transportador. Para todas las muestras, se empleó agua 18 MΩ, obtenida de un sistema Nano pure (Barnstead Thermolyne, Alemania). Asimismo, se empleó un baño de ultrasonido de la casa Cole Parmer, modelo 8894 con porta muestra circular semigiratoria.

La solución de sudor artificial utilizada en este estudio, se preparó a partir de sulfato de calcio anhidro (CaSO_4) al 99,9% y cloruro de sodio (NaCl) al 99,8%, ambos de la casa Baker Analyzed Reagent; sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) al 99,5% y urea (H_2NCONH_2) al 99,8%, los dos marca Merck, sulfato de potasio (K_2SO_4) al 99,5% de la casa Riedel de Haen. La proporción de las sales para la preparación del sudor artificial se indica en la figura 10.

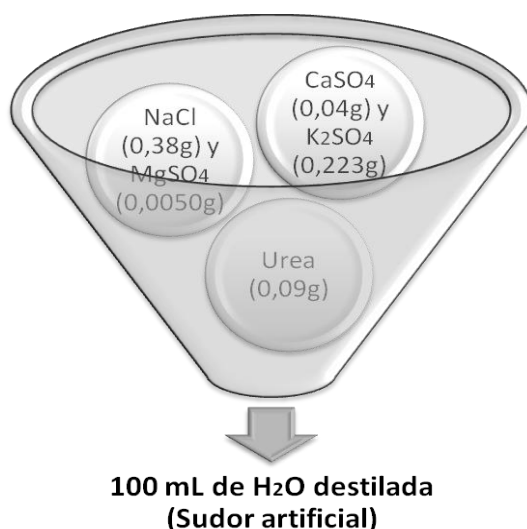


Figura 10. Proporción de las distintas sales para la preparación de 100mL de una solución de sudor artificial.

4.3 Materiales de referencia

El material de referencia utilizado estuvo constituido por: las muestras certificadas NIST-1566b de tejido de ostra, NIST-2976 de tejido de mejillón, NCS ZC 81002b de cabello y Urine SeronormTM.

4.4 Muestreo.

Se analizaron muestras de cabello y orina de niños espectro autista del Centro Integral para la Estimulación Cognitiva y Comunicativa (CIPECC), con edades comprendidas entre 2 y 15 años.

Las muestras de cabello y orina fueron tomadas considerando factores pre-analíticos como: edad, sexo, alimentación y medicación, que pueden influir en los resultados de la determinación de elementos traza en estas. Para ello se aplicó la encuesta que se presenta en el apéndice 6.

Asimismo, se presentó a los representantes toda la información correspondiente al estudio, a través del folleto que se muestra en el apéndice 7, pudo clasificarse a los niños según la severidad de autismo que presentaron, en función de diagnósticos realizados por médicos calificados.

Para la recolección de la orina (24 horas), se tomaron por 24 horas las micciones del infante, exceptuando la primera micción del día, en botellas color ámbar; manteniéndolas bajo refrigeración hasta el momento de su tratamiento.

En el caso del cabello, se procedió a cortar una porción de aproximadamente un gramo, de la zona occipital de la cabeza del infante lo más cercana al cuero cabelludo. Las mismas fueron depositadas en bolsas plásticas hasta el momento de su digestión.

4.5 Metodología experimental.

La metodología experimental de este estudio se encuentra dividida en dos partes: la primera, destinada para optimizar parámetros metodológicos y la determinación de las figuras de mérito correspondientes. La segunda parte, se dedicó al análisis de las muestras de cabello y orina de niños de Espectro Autista y de un grupo control (niños sin autismo).

Parte I. Optimización de parámetros instrumentales y metodológicos para el análisis de las muestras.

I.4.5.1 Optimización de los parámetros instrumentales para la determinación de Hg en muestras de orina y cabello por CV-AAS.

Para la optimización de los parámetros instrumentales se adoptó un modelo univariado, en el cual se evaluaron diferentes factores en función de la máxima señal de absorbancia con la menor variación entre las medidas. Los factores estudiados fueron: la concentración del reductor (NaBH_4) y la influencia de los diferentes ácidos (HNO_3 y HCl) en la reacción del mercurio con el agente reductor utilizado (NaBH_4). Partiendo de concentraciones de ácido (5%) y flujo de reductor (5mL/min), previamente optimizados por Díaz ^[106].

Para optimar la concentración del NaBH_4 , se midió la señal de absorbancia de un patrón de Hg de $3\mu\text{g/L}$, utilizando diferentes concentraciones de NaBH_4 preparadas entre 0,1 y 0,4% p/v.

En el caso de la influencia de distintos ácidos, el estudio se realizó construyendo curvas de calibración de seis patrones (0.5, 1, 3, 5, 10, 20 $\mu\text{g/L}$) a concentraciones iguales de ácido, empleando como ácidos transportadores, HCl y HNO_3 , ambos al 5%.

I.4.5.2 Optimización de la metodología de análisis de muestras de cabello para la determinación de Hg por CV-AAS y Cd por ICP-OES.

I.4.5.2.1 Optimización del tiempo y número de lavados para la determinación mercurio (Hg) en cabello.

Los estudios sobre el efecto de los metales presentes en el cabello, poseen el principal inconveniente de no poder distinguir entre los elementos incorporados por mecanismos endógenos o exógenos. Tal distinción es muy importante, debido a que los metales incorporados mediante un mecanismo exógeno pueden influir apreciablemente en la interpretación de los resultados,

especialmente cuando se utiliza el cabello como bioindicador. Es por esto, que como primer paso, se llevó a cabo un enriquecimiento con sudor artificial, a partir de soluciones con concentraciones de Cd y Hg conocidas.

El principal propósito de este análisis, fue verificar la existencia o ausencia de afinidad del cabello hacia elementos como Hg y Cd (mecanismo exógeno), y así, determinar la cantidad de metal que puede ser adsorbido por el mismo. Finalmente, en función del método de lavado empleado por Rojas^[98] (analizó este efecto para el resto de los elementos estudiados en este trabajo: Zn, Cu, Cr. Se y Pb), efectuar las modificaciones necesarias que permitieran obtener la mayor eficiencia de remoción del contenido de mercurio y cadmio de carácter exógeno, que pudiera adherirse al tejido objeto de estudio.

Para enriquecer la superficie del cabello con Cd y Hg, las muestras fueron impregnadas con 5mL de sudor artificial, con una concentración de 5mg/L de cada elemento. Se dejó reposar por un periodo mayor de 24 h, para asegurar que se adsorbiera la mayor cantidad de los elementos que estaban presentes en la solución. Luego, se lavó con agua desionizada y se dejó secar en una estufa a una temperatura de 60°C. Finalmente, las muestras de cabello fueron digestadas partiendo del procedimiento señalado previamente en la sección II.4.4.1.2 de este trabajo y, se analizaron empleando el CV-AAS para Hg y para Cd el ICP-OES. Cada análisis se realizó por triplicado y los resultados obtenidos fueron comparados con los de la muestra de cabello sin contaminar.

Para establecer la cantidad de metal adsorbido o removido de la superficie del cabello, se midieron muestras contaminadas y sin contaminar con una solución de sudor artificial, de manera tal, que a través de las ecuaciones (Ec.). 1 y 2, pudieran obtenerse tales cantidades:

$$\text{C.M.A}^* = \text{M.C.S}^{***} - \text{M.S.S}^{**} \quad [\text{Ec. 1}]$$

* C.M.A= Cantidad de metal adsorbido (µg/g)

** M.S.S= Muestra sin sudor ($\mu\text{g/g}$)

*** M.C.S= Muestras con sudor sin lavar ($\mu\text{g/g}$)

$$\text{C.M.R}^1 = \text{M.C.S}^3 - \text{M.C.S.L}^2 \quad [\text{Ec. 2}]$$

1 C.M.R= Cantidad de metal removido ($\mu\text{g/g}$)

2 M.C.S.L= Muestra con sudor + lavado ($\mu\text{g/g}$)

3 M.C.S= Muestras con sudor sin lavar ($\mu\text{g/g}$)

Para facilitar la interpretación de los resultados y apreciar el efecto de los lavados, se calculó el siguiente factor:

- i. **Porcentaje elemental de origen exógeno removido por los agentes de lavado:** provee información sobre la proporción de masa total removida, de origen exógeno y se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Remoción} = 100 \left[1 - \frac{\text{M.C.S.L } (\mu\text{g/g})}{\text{M.C.S } (\mu\text{g/g})} \right] \quad [\text{Ec. 3}]$$

I.4.5.2.2 Estudio de la adsorción de Hg en recipientes de plástico.

Este análisis se realizó con el propósito de verificar si existían problemas de adsorción de Hg al utilizar material de plástico para el análisis de cabello. Para ello, se trabajó con una muestra de cabello determinada, de la cual se pesaron 4 réplicas en las mismas proporciones, tanto en recipientes de vidrio, como en recipientes de plástico. Una vez pesadas, para dos de las réplicas de cada recipiente se siguió el procedimiento que se indica en la figura 11.

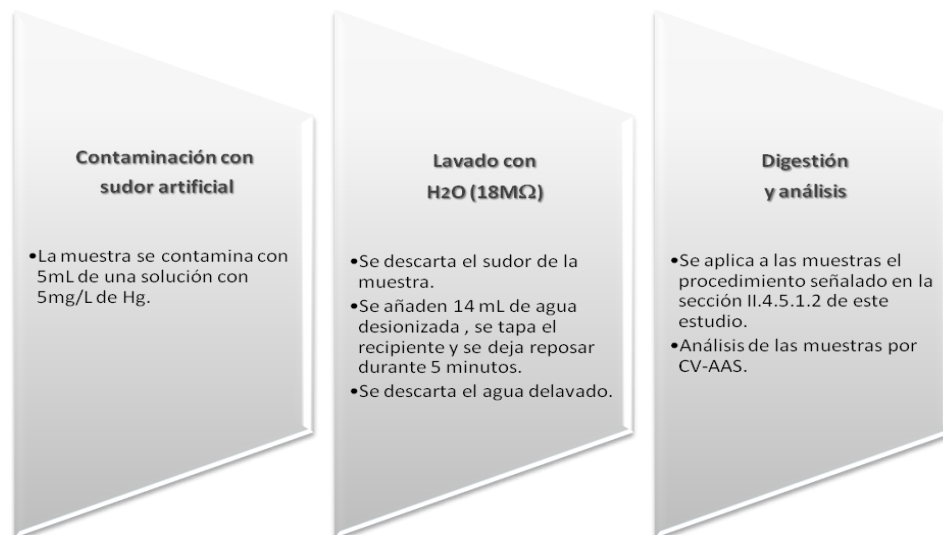


Figura 11. Procedimiento desarrollado para el estudio de la adsorción de mercurio en recipientes de plástico.

Las réplicas restantes fueron incluidas en el proceso previamente señalado, a partir del último bloque, en el cual se dividieron las réplicas de cada grupo (muestras contaminadas y sin contaminar) con el objeto de aplicar el lavado sólo a la mitad de ellas. Finalmente, cada análisis se realizó por triplicado y se obtuvieron los resultados para cada receptáculo de muestra.

I.4.5.2.3 Validación de las metodologías de análisis.

La validación de la metodología de análisis aplicada a las muestras de orina, se realizó analizando por triplicado las muestras del material certificado Seronorm™ para la determinación de Hg. Debido a que las concentraciones del resto de los elementos objeto de estudio, se encontraban por debajo de los límites de detección de la técnica empleada (ICP-OES) en la muestra certificada de orina, se hizo necesaria la validación de Cd, Cu, Zn, Cr, Pb y Se en orina, así como Cd en cabello, a través de un estudio de recuperación. Para ello, se enriquecieron las muestras con 400 ng/g de cada elemento a certificar, estas concentraciones están en el orden que se espera obtener en este tipo de muestras. Se analizaron tres réplicas de la muestra con y sin enriquecimiento.

Asimismo, se emplearon muestras certificadas de cabello, tejido de mejillón y tejido de ostras, para la validación del métodos empleado para la determinación de Pb, Cr, Cu, Se, Hg y Zn en las muestras de cabello.

El tratamiento aplicado para la validación de las metodologías de análisis de orina y cabello, se indican en las figuras 12 y 13 respectivamente, exceptuando en el caso del cabello los procedimientos de lavado.

I.4.5.2.4 Validación de las metodologías de análisis.

Para determinar los límites de detección y cuantificación, se midió 10 veces la señal del blanco, a cuyo conjunto de datos se les calculó la media y la desviación estándar. Siendo el límite de detección igual al promedio de las medidas del blanco, más tres veces la desviación estándar del mismo ($LOD = \bar{y}_b + 3s_b$).

Parte II. Análisis de las muestras de cabello y orina de niños de Espectro Autista.

II.4.5.1 Tratamiento de las muestras.

II.4.5.1.1 Tratamiento de muestras de orina 24 horas.

Las muestras de orina fueron digestadas según la metodología optimizada por Carrión, Caetano, Guillén, Avendaño y Hernández ^[95,96], para la determinación de Hg (ver figura 12).

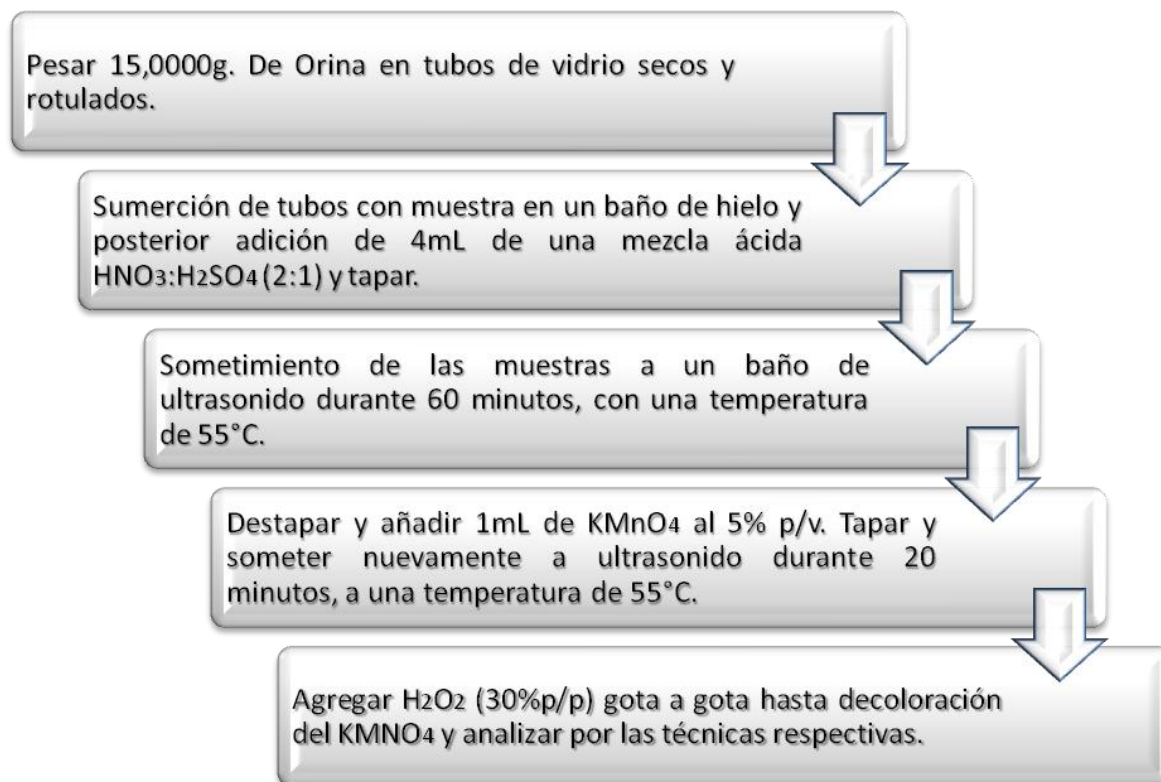


Figura 12. Procedimiento experimental para la digestión de las muestras de orina 24 horas.

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.

II.4.5.1.2 Tratamiento de muestras de cabello.

Las muestras de cabello fueron tratadas partiendo de la metodología optimizada por Pérez y Rojas^[97,98], para la determinación de Pb, Cr, Cu, Se y Zn, tal como lo indica la figura 13.

Muestra	• Pesar 0,2000 gramos en tubos de plástico.
Lavado con acetona	• Se agregan a la muestra 14mL de acetona, se tapa el recipiente y se somete a 3 horas de ultrasonido (35°C). Se descarta la acetona
Lavado con EDTA	• Se agregan a la muestra 14mL de EDTA, se tapa el recipiente y se somete a 3 horas de ultrasonido (35°C). Se descarta el EDTA.
3 lavados con H₂O (18MΩ)	• Se añaden 14 mL de agua, se tapa el recipiente y se somete a 15 minutos de ultrasonido (35°C). Se descarta el agua.
Digestión ácida con HNO₃	• Se agregan 1,5 mL del ácido a la muestra, se tapa el recipiente y se somete a ultrasonido (45°C), hasta que se produce la disolución total.
Adición de H₂O₂	• Se adiciona 1mL de H₂O₂ a la muestra, se tapa y se somete a digestión ultrasónica (45°C) durante 3 horas.
Análisis	• Se enrasa la muestra a un volumen de 10mL y posteriormente se analiza a través de la técnica correspondiente.

Figura 13. Procedimiento experimental para la digestión de muestras de cabello.

Parte I. Optimización de parámetros instrumentales y metodológicos para el análisis de las muestras.

I.5.1 Optimización de los parámetros instrumentales para la determinación de Hg en muestras de orina y cabello por CV-AAS.

Los resultados obtenidos para la concentración del agente reductor, NaBH_4 , son representados en la figura 14, en la cual se observa un incremento significativo de la señal hasta una concentración de 0,3%p/v y luego una disminución de la señal a partir de esa concentración, sin embargo, para esta concentración la reproducibilidad de la medidas disminuye considerablemente, asociado al hecho de que la reacción se vuelve más violenta, como resultado de que la mayor concentración de NaBH_4 tiende a generar una mayor cantidad de hidrógeno que puede llegar a saturar la reacción, lo cual origina en primera instancia gran cantidad de burbujas en el reactor que disminuye la reproducibilidad y, en segundo lugar, una baja en la señal de absorbancia. En tal sentido, se seleccionó como concentración óptima: 0,2% p/v de borohidruro de sodio (NaBH_4).

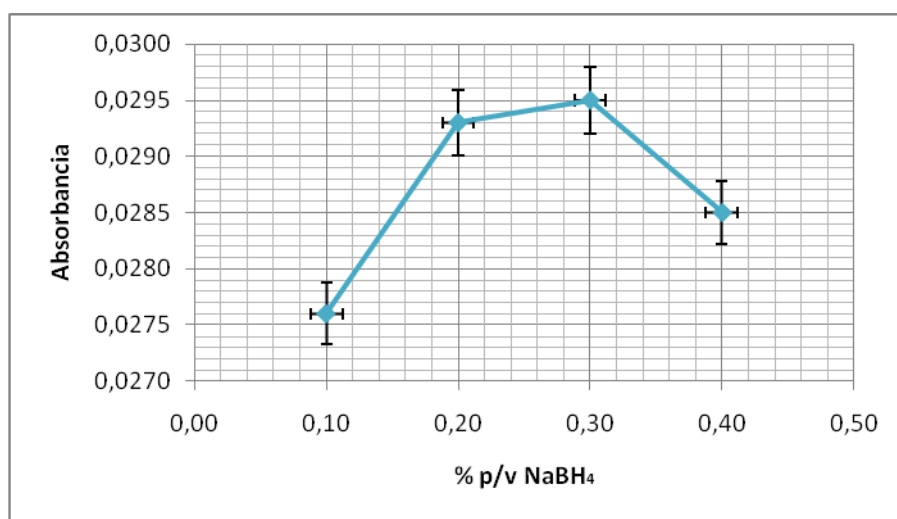


Figura 14. Absorbancias de una solución de mercurio (Hg) de $3\mu\text{g/L}$ en función de diferentes concentraciones de NaBH_4 .

I.5.1.2 Estudio de la naturaleza del ácido en la absorbancia, con borohidruro de sodio (NaBH₄) como agente reductor.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 15, en la cual puede apreciarse una mayor pendiente para el HCl que para el ácido nítrico HNO₃ [ver tabla IV]. En consecuencia y, considerando que una mayor pendiente implica mayor sensibilidad, aun cuando la diferencia entre ellas no fue tan grande, se decidió trabajar con el HCl para la determinación de Hg por CV-AAS.

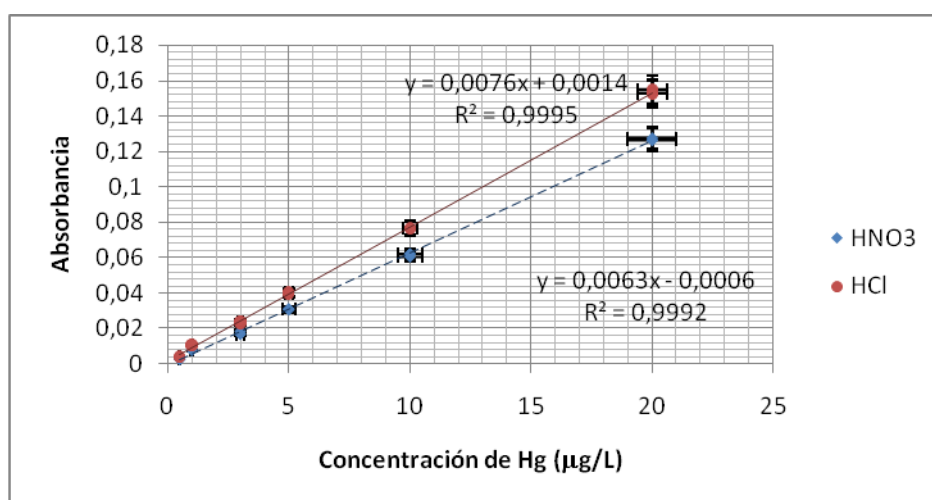


Figura 15. Absorbancia en función de la concentración de mercurio (Hg), con NaBH₄ al 0,2%p/v.

Tabla IV. Ecuaciones de la recta obtenidas para las curvas de calibración de los diferentes ácidos de arrastre analizados.

Ácidos	Ec. de la recta	R ²
HCl	$y = 0,0076x + 0,0014$	0,9995
HNO ₃	$y = 0,0063x + 0,0006$	0,9992

I.5.2 Optimización de la metodología de análisis de muestras de cabello para la determinación de Hg por CV-AAS y Cd por ICP-OES.

I.5.2.1 Optimización del tiempo y número de lavados para la determinación Hg en cabello.

El estudio sobre el efecto de los solventes para el lavado de metales en cabello, fue optimizado por Rojas ^[98] para todos los metales estudiados en este trabajo, excepto Cd y Hg. Para los cuales, tal como lo indica la tabla V, los procedimientos de lavado empleados por Rojas ^[98], fueron deficientes en cuanto a la remoción de la carga exógena proporcionada por la adición del sudor artificial, pues, se observa que parte del Cd y el Hg se adsorben al cabello y además, no se remueven por completo tras la aplicación de los lavados.

Tabla V. Adsorción y remoción de Cd y Hg en cabello por el procedimiento de digestión de Rojas.

Elemento	CMA (µg/g)	CMR (µg/g)	%Remoción
Cd	0,0921	0,0861	62,2
Hg	0,9106	0,6854	68,4

En consecuencia, la optimización del método de lavado para la determinación de Cd y Hg, se enfocó en la modificación de los tiempo de lavado de las muestras con acetona y EDTA, así como en la adición de un lavado extra con agua desionizada, con la finalidad de obtener resultados precisos. En tabla VI, puede observarse que a medida que se aumenta el tiempo de lavado con acetona y EDTA, aumenta también el porcentaje de remoción de Cd y Hg en cabello. Asimismo, es observable que la adsorción de cadmio en cabello tiende a ser mayor que la de mercurio.

Tabla VI. Variación de los tiempos de lavado con Acetona y EDTA para optimizar la determinación de Hg y Cd en muestras de cabello.

Tiempo (min)	Cd			Hg		
	CMA (µg/g)	CMR (µg/g)	%Remoción	CMA (µg/g)	CMR (µg/g)	%Remoción
180*	0,0921	0,0861	62,2	0,9106	0,6854	68,4
210	0,0822	0,0906	72,7	0,9097	0,7786	77,8
240	0,0981	0,1065	76,4	0,9425	0,8544	82,6
280	0,0931	0,1080	76,8	0,9707	0,8785	82,7

* Para el procedimiento de los 180 minutos no se aplicó el lavado extra con agua destilada.

- Los tiempos de lavado corresponden a 180 minutos para cada lavado (uno con Acetona y otro con EDTA),
- Los tiempos de lavado con agua fueron de 20 minutos cada uno.

Tales resultados sugieren, que los datos que deriven del análisis de Hg y Cd en cabello, incluirán un error adicional, correspondiente a las porciones de metal que puedan adherirse al mismo y, que dependerán de la exposición del individuo a estos elementos. En base a esto, se modificó la metodología para la digestión del cabello, obteniéndose el procedimiento que se indica en la figura 16.

Muestra	•Pesar 0,2000 gramos en tubos de plástico.
Lavado con acetona	•Se agregan a la muestra 14mL de acetona, se tapa el recipiente y se somete a 4 horas de ultrasonido (35°C). Se descarta la acetona
Lavado con EDTA	•Se agregan a la muestra 14mL de EDTA, se tapa el recipiente y se somete a 4 horas de ultrasonido (35°C). Se descarta el EDTA.
4 lavados con H₂O (18MΩ)	•Se añaden 14 mL de agua, se tapa el recipiente y se somete a 20 minutos de ultrasonido (35°C). Se descarta el agua.
Digestión ácida con HNO₃	•Se agregan 1,5 mL del ácido a la muestra, se tapa el recipiente y se somete ultrasonido (45°C), hasta que se produce la disolución total.
Adición de H₂O₂	•Se adiciona 1mL de H ₂ O ₂ a la muestra, se tapa y se somete a digestión ultrasónica (45°C) durante 3 horas.
Análisis	•Se enrasa la muestra a un volumen de 10mL y posteriormente se analiza a través de la técnica correspondiente.

Figura 16. Procedimiento experimental para la digestión de muestras de cabello de este estudio.

I.5.2.2 Estudio de la adsorción de mercurio (Hg) en recipientes de plástico.

En la tabla VII, se señalan las concentraciones obtenidas para la muestras de cabello, contaminadas y sin contaminar con Hg en diferentes tipos de material; pudiéndose notar que no existen entre ellas diferencias significativas. Por lo tanto, puede afirmarse que los recipientes de plástico no adsorben Hg y pueden ser utilizados de manera confiable para la digestión de muestras en las que vaya a determinarse este elemento.

Tabla VII. Comparación entre receptáculos de muestras de distinto material para la determinación de Hg.

Material	CMCS($\mu\text{g/g}$)	CMSS ($\mu\text{g/g}$)	CMCSL ($\mu\text{g/g}$)	CMSSL ($\mu\text{g/g}$)
Vidrio	$1,034 \pm 0,013$	$0,092 \pm 0,002$	$0,180 \pm 0,008$	$0,056 \pm 0,003$
Plástico	$1,035 \pm 0,014$	$0,090 \pm 0,002$	$0,180 \pm 0,007$	$0,057 \pm 0,002$
$t_{\text{exp}(95\%)}$ [$t_{\text{teo}} = 2,23$]	0,05	0,71	0,00	0,28

- CMCS = concentración de la muestra con sudor

- CMSS = concentración de la muestra sin sudor

I.5.3 Validación de las metodologías de análisis.

Empleando las metodologías descritas en el capítulo previo, se obtuvieron las concentraciones mostradas en la tabla VIII, con un intervalo de confianza del 95% para cada elemento; las cuales, se encuentran dentro del intervalo correspondiente de concentraciones reportadas para cada material certificado.

Tabla VIII. Concentraciones obtenidas* y certificadas en los materiales de referencia

Material certificado	Concentración	Cu	Zn	Hg**	Cr	Pb
SeronormTM Trace Element Urine LOT 0511545	Obtenida ($\mu\text{g/L}$)	---	---	$45,6 \pm 1,6$	---	---
	Certificada ⁽¹⁾ ($\mu\text{g/L}$)	---	---	$36,1 - 45,3$	---	---
	IC _{95%} ($\mu\text{g/L}$) [*]	---	---	$45,6 \pm 1,3$	---	---
Cabello NCS ZC 81002b	Obtenida ($\mu\text{g/g}$)	$33,13 \pm 0,98$	187 ± 2	---	$7,58 \pm 0,21$	$3,72 \pm 0,04$
	Certificada ⁽¹⁾ ($\mu\text{g/g}$)	$33,60 \pm 2,30$	191 ± 16	---	$8,74 \pm 0,97$	$3,83 \pm 0,18$
	IC _{95%} ($\mu\text{g/g}$) [*]	$33,13 \pm 2,44$	187 ± 4	---	$7,58 \pm 0,51$	$3,72 \pm 0,10$
Tejido de Ostra NIST - 1566b	Obtenida ($\mu\text{g/Kg}$)	---	---	$0,0381 \pm 0,0008$	---	---
	Certificada ⁽¹⁾ ($\mu\text{g/Kg}$)	---	---	$0,0371 \pm 0,0013$	---	---
	IC _{95%}	---	---	$0,0381 \pm 0,0006$	---	---

Tejido de Mejillón NIST- 2976	Obtenida (µg/Kg)	---	---	65,7 ± 1,7	---	---
	Certificada (µg/Kg)	---	---	61,0 ± 3,6	---	---
	LC _{95%}	---	---	65,7 ± 1,7	---	---

** Valor reportado como Hg total en la muestra

NR: no reportado; CV: coeficiente de variación, IC: intervalo de confianza expresado como $\bar{x} \pm IC_{95\%}$

Asimismo, el estudio de recuperación arrojó los resultados que se muestran en la tabla IX.

Tabla IX. Concentraciones obtenidas por porcentaje de recuperación.

Elementos		Zn	Cu	Cr	Se	Pb	Cd*	Cd**
Muestra sin Contaminar	Promedio (µg/L)	69,00	22,21	17,82	232,71	9,41	< LD	< LD
	S (µg/L)	0,12	0,17	0,23	1,11	0,27	----	----
	CV (%)	0,17	0,76	1,32	0,48	2,91	----	----
	IC _(95%) (µg/L)	68,72 – 69,29	27,79 – 22,63	17,24 – 18,40	229,94 – 235,47	8,73 – 10,09	----	----
Muestra Contaminada	Promedio (µg/L)	465,26	421,70	417,62	625,18	408,64	399,85	396,10
	S (µg/L)	4,41	0,67	0,75	4,03	0,56	1,68	1,98
	CV (%)	0,95	0,16	0,18	0,65	0,14	0,42	0,50
	IC _(95%) (µg/L)	454,31 – 476,22	420,02 – 423,37	415,75 – 419,50	615,17 – 635,20	407,24 – 410,03	395,68 – 404,02	391,18 – 401,01
Concentración exógena en la muestra	Promedio (µg/L)	396,26	399,49	399,80	392,48	399,22	399,85	396,10
	S (µg/L)	4,52	0,60	0,52	5,01	0,64	1,68	1,98
	CV (%)	1,14	0,15	0,13	1,28	0,16	0,42	0,50
	IC _(95%) (µg/L)	385,04 – 407,49	397,99 – 400,98	398,52 – 401,09	380,05 – 404,90	397,63 – 400,82	395,68 – 404,02	391,18 – 401,01
Factor de recuperación	(µg/L) agregados	400 ± 1	400 ± 1	400 ± 1	400 ± 1	400 ± 1	400 ± 1	400 ± 1
	FR (%)	99,07	99,87	99,95	98,12	99,81	99,96	99,02

LD: Límites de detección de la técnica

CV: coeficiente de variación, IC: intervalo de confianza expresado como $\bar{x} \pm IC_{95\%}$

Cd*: cadmio en orina ; Cd**: cadmio en cabello

FR: factor de recuperación

De acuerdo a las concentraciones y factores de recuperación obtenidos para cada elemento, puede afirmarse que las metodologías empleadas para el tratamiento y digestión de las muestras, así como su análisis, garantizan la exactitud de las determinaciones de los elementos objeto de estudio en las muestras de orina y cabello.

I.5.4 Figuras de mérito obtenidas para las metodologías de análisis empleadas.

En la tabla X, se señalan los límites de detección (LOD) obtenidos para la determinación de mercurio total mediante CV-AAS; y de Zn, Cu, Cr, Se, Pb y Cd, por ICP-OES. Puede observarse que los LOD experimentales se encuentra por encima del valor reportado^[103]. Tal diferencia, puede ser atribuida a pérdidas de sensibilidad en los equipos, producto del desgaste del mismo; repercusión de los efectos de dilución característicos del método, u otras condiciones de trabajo no aptas para la obtención de los límites de detección reportados.

Tabla X. Límites de detección y concentración característica para el método aplicado.

Elemento	Reportados para la técnica		Método	
	LOD(μg/L)	Co(μg/L)	LOD(μg/L)	Co(μg/L)
Hg*	0,01	NR	0,06	0,60
Zn	3,0	NR	33,5	105,5
Cu	2,0	NR	3,0	20,0
Cr	5,0	NR	16,4	0,035
Se	20,0	NR	21,0	< Id
Cd	8,0	NR	10,0	3,22
Pb	20,0	NR	62,8	< Id

- NR = No reportado

- Co = concentración característica para una señal de absorbancia de 0,0044ua.

- El Hg fue determinado por CV-AAS y el resto de los elementos por ICP-OES.

- Id: límites de detección

PARTE II. Análisis de muestras de cabello y orina de niños con Síndrome de Espectro Autista.

II.5.1 Análisis de elementos traza en muestras de orina de niños de espectro autista.

Las concentraciones obtenidas para los metales Zn, Cu, Cr, Se, Pb y Hg, en las muestras de orina 24 horas, pertenecientes a una población de 29 niños con Síndrome de Espectro Autista, se representan en la figura 17 y se indican en el apéndice 1.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mediana derivada de los mismos y en base a los valores de referencia reportados para cada elemento (ver tabla XI), puede decirse que en estos infantes la distribución de concentraciones de metales esenciales como Zn y Cr tiende a ser de normal a baja, mientras que para elementos esenciales como Cu y Se, la propensión es muy variable, sin embargo, las concentraciones más frecuentes (mediana) se mantienen dentro del intervalo de concentraciones de referencia.

Por su parte, el contenido de metales tóxicos como Pb, Cd y Hg, se mantiene siempre por debajo de los valores máximos permisibles para este tipo de muestras.

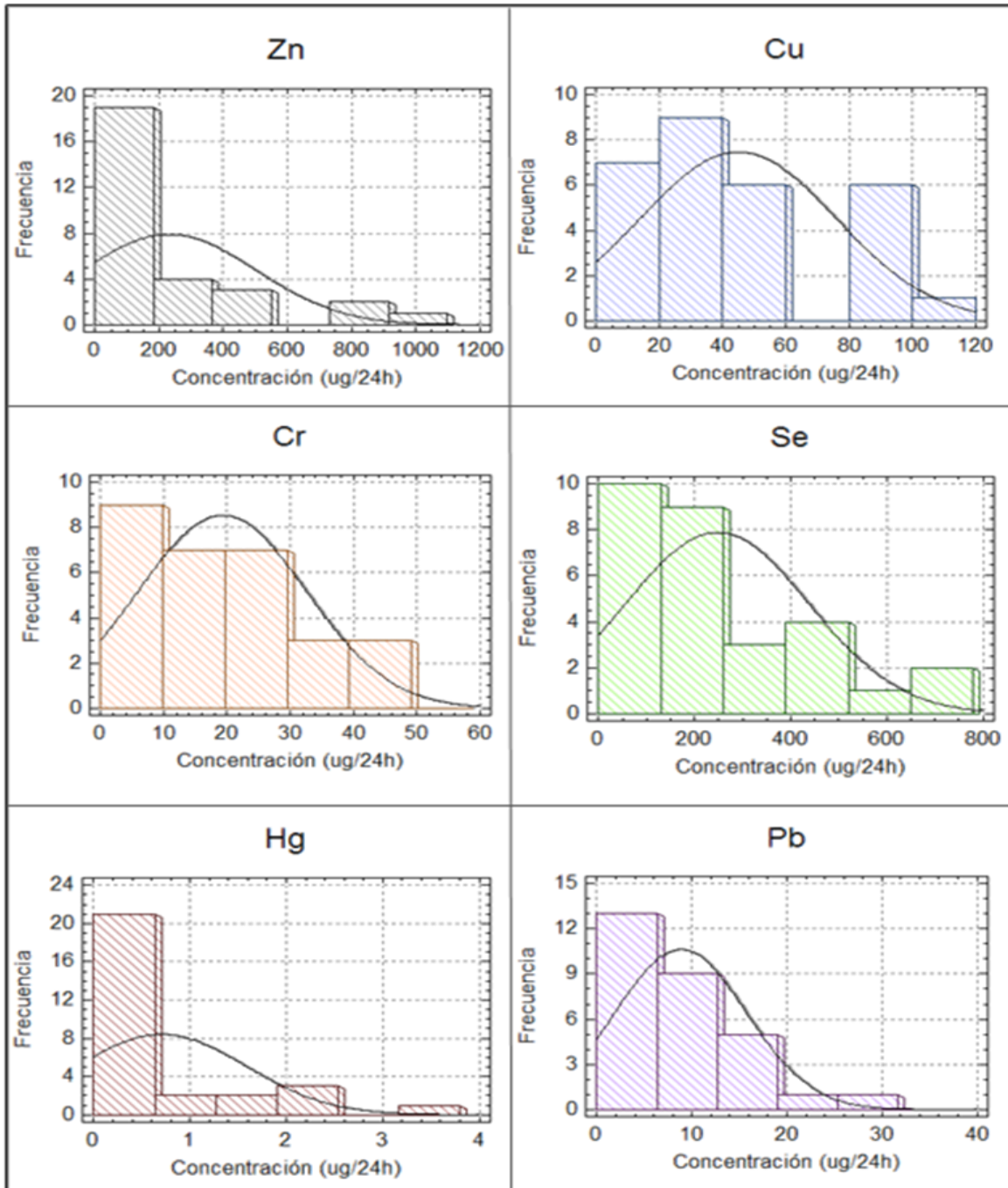


Figura 17. Distribución de concentraciones de Zn, Cu, Cr, Se, Pb y Hg (Hg total), en muestras de orina 24 horas de la población de niños con Síndrome de Espectro Autista.

Tabla XI. Distribución de concentraciones de Zn, Cu, Cr, Se, Pb y Hg (mercurio total), en la población de niños con Síndrome de Espectro Autista.

Elemento	Intervalo de concentraciones grupo autista (µg/24h)	Intervalo de concentraciones grupo control (µg/24h)	Mediana Obtenida para grupo autista (µg/24h)	Mediana Obtenida para grupo control (µg/24h)	Intervalo de concentraciones de referencia ¹ (µg/24h)
Zn	2,96 – 983,19	22,41 – 362,26	124,2 ± 268,4	223,4 ± 120,221	120 – 1300
Cu	6,44 – 102,44	4,09 – 62,09	35,62 ± 30,98	34,43 ± 20,81	11 – 68
Cr	1,67 - 48,09	5,76 – 63,51	17,55 ± 13,32	37,98 ± 21,72	20 – 114
Se	21,3 – 667,4	78,2 – 965,23	187,13 ± 190,66	555,39 ± 315,74	54 – 390
Pb	0,29 – 29,09	1,10 – 27,41	8,21 ± 6,89	16,55 ± 9,57	< 20
Hg	0,04 – 3,51	0,15 – 2,16	0,33 ± 0,87	1,29 ± 0,69	< 5
Cd	< LD	< LD	ND	ND	< 3

ND: no detectable , < LD: menor al límite de detección de la técnica

Pudo notarse que las concentraciones determinadas presentaron una dispersión elevada que es reflejada por la desviación estándar obtenida para cada elemento. Esto, es una consecuencia directa del tipo de muestras objeto de análisis, donde las concentraciones de cada elemento pueden verse afectadas por variables como edad, nutrición, la ingesta de diversos fármacos, patologías del paciente, entre otros. Adicionalmente, la distribución de concentraciones obtenidas no siguen, en su mayoría, una distribución normal, es por ello, que se emplea el valor de la mediana para la interpretación de estos datos (ver tabla XI).

Además del estudio de la población de niños con Síndrome de Espectro Autista, se analizaron también muestras de orina 24 horas, de 10 niños sanos (denominados como población control), para los cuales la distribución de concentraciones de los elementos esenciales como Zn, Cu y Cr, indican mayor frecuencia para concentraciones que se mantienen dentro y en reducidas ocasiones, por debajo de las correspondientes al intervalo de referencia (ver tabla XI). En el caso del Se, su comportamiento en estos niños difiere de los demás

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.

elementos esenciales, porque su tendencia es de normal a elevada; este resultado era de esperarse considerándose que en Venezuela la ingesta diaria de Se es mayor que en otras regiones (80 – 500 μ g/día)^[110].

Por su parte, las concentraciones correspondientes a los elementos tóxicos como Pb y Hg en orina, se mantuvieron en su mayoría, al igual que para el grupo autista, por debajo de los valores máximos permisibles para este tipo de muestras.

Finalmente, los resultados obtenidos, son útiles para establecer comparaciones entre los niveles de los metales objeto de estudio de las poblaciones control y autista. Pudiéndose notar, tal como lo indica la figura 18, las siguientes tendencias:

- ✓ **Zinc** : la población autista se caracterizó por presentar niveles de Zn de bajos a normales. Mientras que para el grupo control, la frecuencia en la excreción del elemento por vía urinaria fue mayor y, aun cuando el estadístico P indica que no existen diferencias significativas entre las medianas de ambos grupos, la figura 18 indica cierta tendencia hacia una mayor excreción de Zn en el grupo control. Por lo tanto, puede decirse que la excreción de Zn es relativamente normal para las dos poblaciones y que existe cierta propensión por parte de los niños autistas a liberarlo en menor proporción que los infantes sanos. Sin embargo, para establecer conclusiones más concluyentes debe trabajarse con poblaciones más grandes y equivalentes (n° de controles similar a n° de autistas).
- ✓ **Cobre**: para el grupo autista los niveles de Cu se mantuvieron entre normales y elevados respecto a la referencia, mientras que los de niños sanos pueden catalogarse de bajos a normales. A pesar de ello, las pruebas estadísticas de Mann-Whitney, no muestran diferencias significativas entre las medianas de ambos grupo, debido probablemente a la dispersión de los

datos. Por tal motivo, puede decirse que los niveles de Cu se mantienen normales para las dos poblaciones de niños analizadas en este estudio.

- ✓ **Cromo:** su excreción fue mayor en la población control que en la autista ($P=0,0464$), presentando un comportamiento normal (con elevada frecuencia de valores dentro de los intervalos de referencia) en el primer caso y tendencia de concentraciones bajas para el segundo (niños autistas).
- ✓ **Selenio:** para este elemento el comportamiento en las poblaciones objeto de estudio, fue distinta (ver tabla 18), aun cuando el estadístico P ($P=0,0688$) señala que no existen diferencia significativa. Pues, en el caso del grupo control, la excreción por vía urinaria de Se fue de normal a elevada, mientras que para los niños con autismo, la liberación del metal fue un poco más variable (de bajas a elevadas). En consecuencia, de considerarse una confianza del 90%, podría aseverarse que la excreción de Selenio por vía urinaria, es mayor en niños sanos.
- ✓ **Plomo:** para la excreción de este elemento por vía urinaria no se observaron diferencias entre niños sanos y de espectro autista. Aun cuando para el grupo control, existen algunos datos cuya magnitud sobrepasó el valor umbral para dicho elemento.
- ✓ **Mercurio:** para este elemento todas las concentraciones obtenidas se encuentran por debajo de los valores máximos permisibles para este tipo de muestras, notándose, sin embargo, que la excreción de Hg fue mayor para niños sanos que para niños de espectro autista ($P=0,0276$).

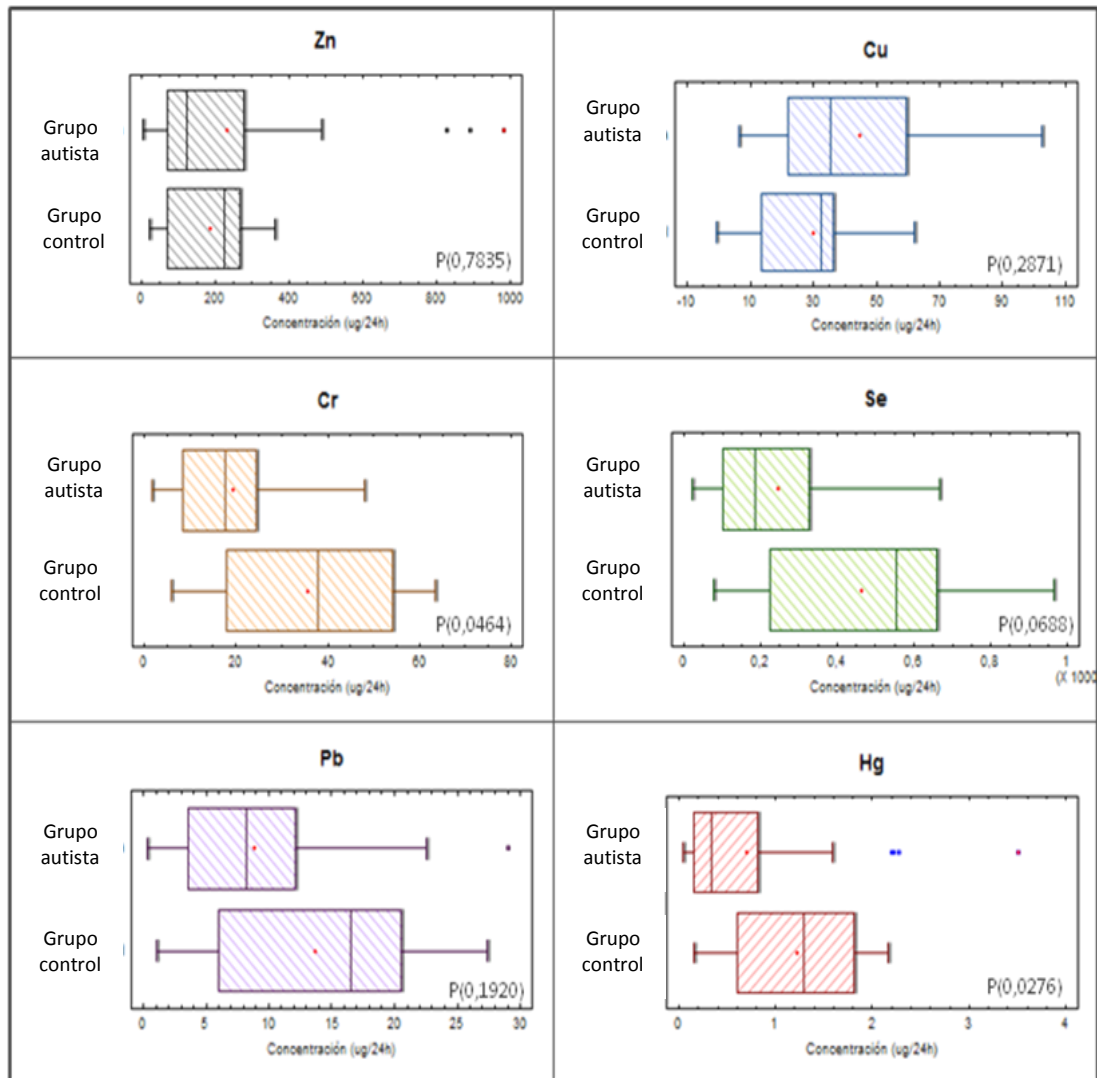


Figura 18. Diagrama de cajas y bigotes de los datos obtenidos para muestras de orina 24 horas de niños autistas y niños sanos.²

La unificación de este tipo de resultados con los datos adquiridos a partir del análisis de Hg, en niños autistas previamente quelados, han hecho asumir a los especialistas que existe la posibilidad de que estos niños estén reteniendo el metal en su organismo.

Efectivamente, Adams^[94], evaluó los niveles de excreción de mercurio en los niños con trastornos del espectro autista en comparación con un grupo control,

² Para la comparación de medianas experimentales de dos grupos se aplicó la prueba de Mann-Whitney, utilizando como hipótesis nula que entre ambas medianas no existen diferencias significativas. Esta hipótesis se cumple cuando el valor de P es mayor o igual a 0,05 y corresponde a un nivel de confianza del 95%.

todos sometidos a tres días de tratamiento con un agente quelante oral, ácido meso-2,3 dimercaptosuccínico (DMSA). Los resultados globales de este análisis, tal como lo señala la tabla XII, mostraron un aumento significativo en las concentraciones de Hg en orina (aumento relativo (RI) = 3.15, p: 0.0002) de los niños de espectro autista.

Tabla XII. Resultados obtenidos por Adams al determinar Hg en orina de niños previamente quelados.

Población	Número de niños	Número de niñas	Media de la edad en años (intervalo)	Media de Hg urinario ($\mu\text{g/g}_{\text{creatinina}}$) (intervalo)
Autista	183	38	6,25 (3 a 15)	4.06 $\pm$ 8.59 (0 a 58.65)
Control	14	4	8,85 (3 a 16)	1.29 $\pm$ 1.54 (0 a 6.2)

Por otro lado, el análisis independiente de los diferentes elementos objetos de estudio, no aportan por sí solos información concluyente. Sin embargo, existen muchas teorías que pueden ajustarse para describir los comportamientos observados.

De hecho, hay dos hipótesis que, de comprobarse su veracidad, podrían unificarse para explicar lo que puede estar ocurriendo con los niños con Síndrome de Espectro Autista. La primera, es la posición de Walsh^{[104][105]}, quien señala que, posiblemente, los niños autistas presentan ya desde el nacimiento un sistema gastrointestinal inmaduro, muy sensible, débil y fácilmente lesionable, cuya causa principal, así como la causa principal del autismo o de algún tipo de autismo, es el funcionamiento defectuoso de las metalotioneinas.

Walsh^{[104][105]} afirma que la afinidad de las MT por los metales pesados tóxicos es notable y el zinc puede ser desplazado de las MT por todos esos metales. Asimismo, asevera que la mayoría de los pacientes autistas muestran una

condición de sobrecarga de cobre que se ha asociado con deficiencias en el aprendizaje, hiperactividad, ansiedad y pobre control del comportamiento.

La segunda teoría, viene dada por observaciones realizadas en numerosos estudios, que afirman que el selenio puede interaccionar en el organismo con una serie de metales (Hg, Pb, Cd, Cu etc), impidiendo el efecto de éstos en diferentes tejidos^[21.36].

Ésta última premisa puede ser conveniente para explicar el por qué de la menor liberación urinaria de Hg y Se en niños autistas que en niños sanos. Pues, se presume que el Se forma complejos estables con este elemento y, que su acción protectora no implica un aumento en la excreción de los mismos, lo que ocurre es la acumulación paralela de Se y el metal (Pb, Cu y/o Hg) en el riñón y el resto de los tejidos.

Para darle mayor validez a lo descrito en el párrafo anterior, se examinaron posibles correlaciones entre las concentraciones de los elementos en orina de niños autistas, las cuales se analizaron empleando como estadístico el coeficiente de Spearman, el cual es poco sensible a la influencia de datos anómalos.

Los resultados numéricos obtenidos, para un 95% de confianza, se presentan en el Apéndice 5, e indican que existe una correlación significativa entre los elementos que se muestran en la figura 19.

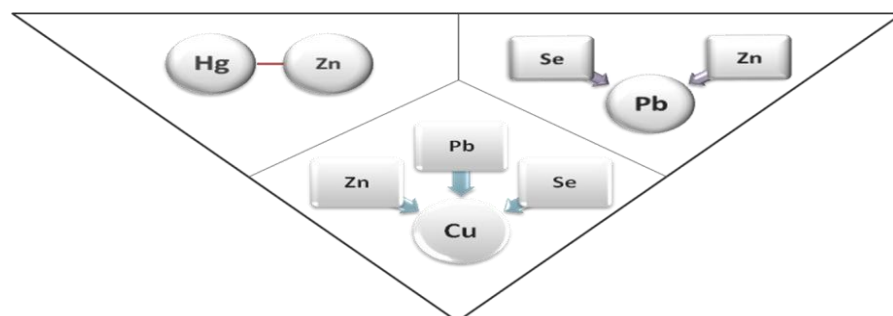


Figura 19. Correlaciones entre elementos en orina de niños autistas, según el coeficiente de Spearman.

Las correlaciones encontradas para Hg, Cu y Pb, apoyan las teorías propuestas de forma parcial, y de ser ciertas, podrían ser útiles para la elaboración de una descripción más completa de los factores que pueden estar influyendo en la aparición del autismo, sustentada por las observaciones obtenidas en esta investigación.

Pues, en el caso del Hg, tal como lo señala la figura 20, se observa que a medida que disminuye la excreción de Hg en orina, también se reduce la liberación de Zn. Tal situación indica que, probablemente, existe algún mecanismo que está siendo afectado en el organismo de los niños con autismo, generando déficits de Zn y retención de Hg. Este comportamiento, podría explicarse considerando que fuera un hecho la alteración de la metalotioneína, como resultado de dos factores^{[104][105]}: un defecto genético que involucra el funcionamiento defectuoso de la MT y una agresión externa durante el desarrollo temprano que la inactiva; pudiendo ser esa agresión (deficiencias de Zn en la dieta del infante y/o fuerte exposición a metales tóxicos) el factor desencadenante de afecciones a la proteína MT y, en consecuencia, de la retención de Hg en diversos tejidos del cuerpo.

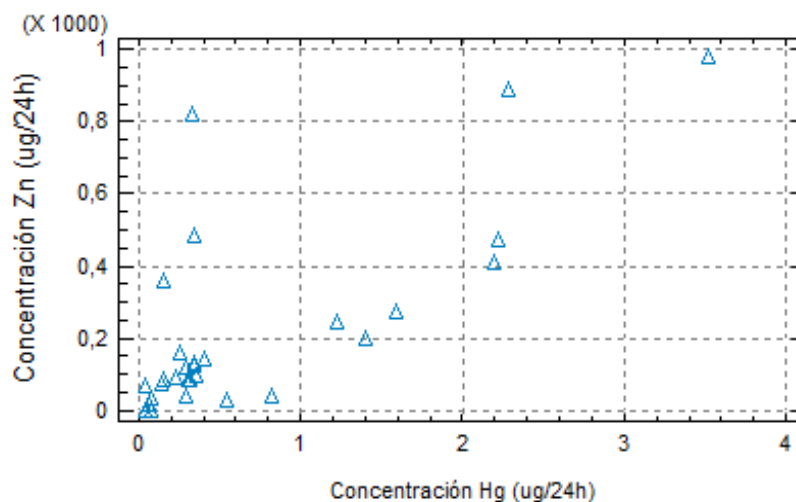


Figura 20. Variación de las concentraciones de Zn respecto a la concentración de Hg en muestras de orina 24 horas de niños de Espectro Autista.

Por su parte, la excreción de Se podría encontrarse ligada al Pb, como lo indica la figura 21, notándose que una mayor expulsión de Se implica también una mayor liberación de Pb. Esta tendencia da indicios de que la función protectora del Se previamente mencionada, probablemente se produce con el Pb, favoreciendo así la formación de complejos Se-Pb que no son excretados por el cuerpo. Tales interacciones podrían ser las responsables de la menor excreción urinaria de Pb por parte de niños con autismo. Sin embargo, estos hechos deben ser verificados en muestras más contundentes como la sangre, considerando que las muestras de orina reflejan estados recientes que pueden verse influenciados por diversos factores externos: dietas, clima, exposición temporal a compuestos tóxicos, entre otros.

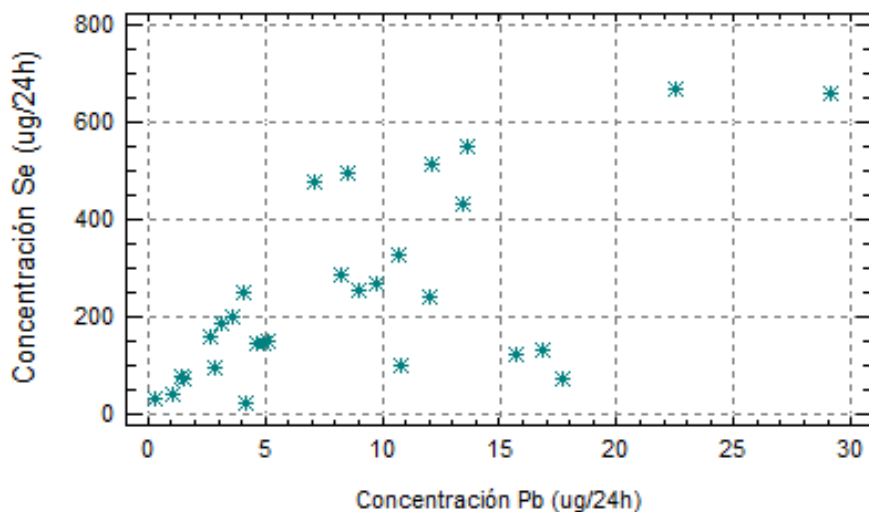


Figura 21. Variación de las concentraciones de Se respecto a la concentración de Pb en muestras de orina 24 horas de niños de Espectro Autista.

Además, puede pensarse que así como los niños autistas pueden retener el Pb por formación de complejos Se-Pb, los niños sanos también podrían hacerlo. Sin embargo, debe notarse que la susceptibilidad de la metabolización de metales pesados en los niños sanos tiende a ser mejor que en niños con Síndrome de Espectro autista, como resultado de que los primeros son menos susceptibles a

presentar alteraciones gastrointestinales que puedan afectar a las proteína encargadas de la excreción de elementos tóxicos del organismo (por ejemplo: la MT), siendo justamente ésta la correlación que posiblemente existe entre las excreciones limitadas de Zn y Pb que suelen presentar los niños de Espectro Autista.

En el caso del Cu, las correlaciones con Zn y Pb eran de esperarse, en términos de las premisas que se manejan, ya que la síntesis de la metalotioneína se encuentra inducida por estos metales (Cu, Pb y Zn). Asimismo, existe congruencia en la correlación hallada entre Cu y Se, porque al igual que el Pb, el Cu también presenta afinidad para formar complejos con su ion. Según esto, la excreción de Cu en orina debería ser similar a la de Se en los niños de Espectro Autista, es decir, la disminución de uno debería implicar la insuficiencia del otro en este tipo de muestra, tal como lo señala la figura 22.

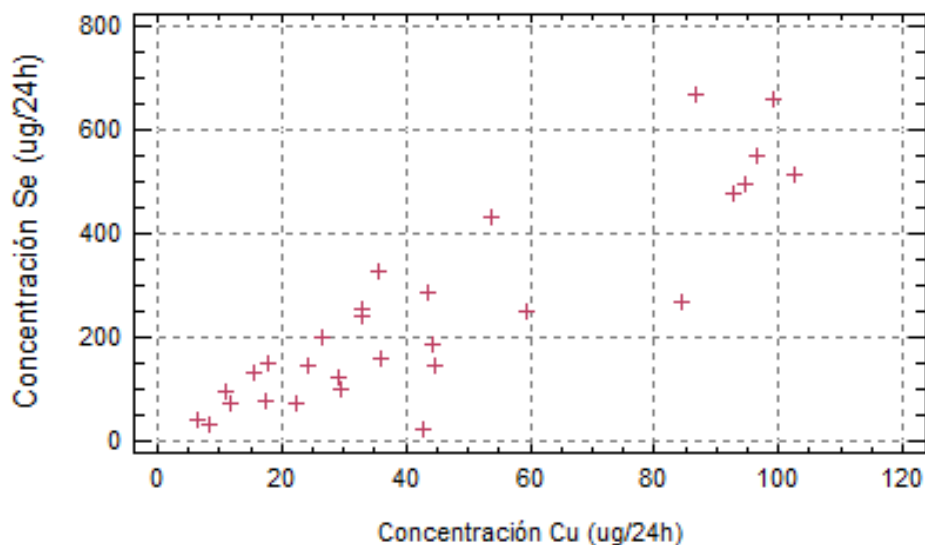


Figura 22. Variación de las concentraciones de Se respecto a la concentración de Cu en muestras de orina 24 horas de niños de Espectro Autista.

Este resultado aporta una información que debe de ser analizada de manera más amplia, ya que numerosas investigaciones señalan que la excreción

de Cu en niños autistas tiende a ser elevada y, que si existe en ellos retención de plomo^{[21][22][23][29][105]}, sin embargo, en este estudio tales hechos no fueron observables por vía urinaria, lo que indica que, de ser correctos ambos resultados, pueden estar influyendo: la existencia de competencias por afinidad Se-Pb y Se-Cu, para la formación de complejos, que están favoreciendo la retención de estos elementos en los niños. Sin embargo, debido al relativamente bajo número de muestras analizados, esto debe ser verificado.

II.5.1.1 Distribución de las concentraciones de elementos traza en muestras de orina de niños de espectro autista, en función del nivel de autismo.

El Síndrome de Espectro Autista, se caracteriza por ser una enfermedad cuyas manifestaciones clínicas son muy variables, tanto, que la agrupación de éstas ha dado origen a múltiples clasificaciones. En este caso, se trabajará con los tipos de autismo que manejan los médicos venezolanos, quienes suelen catalogarlos como leve, moderado y severo.

En función de tal clasificación, se procedió a agrupar los valores obtenidos para cada elemento. Los resultados obtenidos de muestran en la figura 23, pudiéndose notar que sólo existen diferencias significativas en el caso de la excreción de Hg, la cual aumenta a medida que disminuye la severidad del autismo.

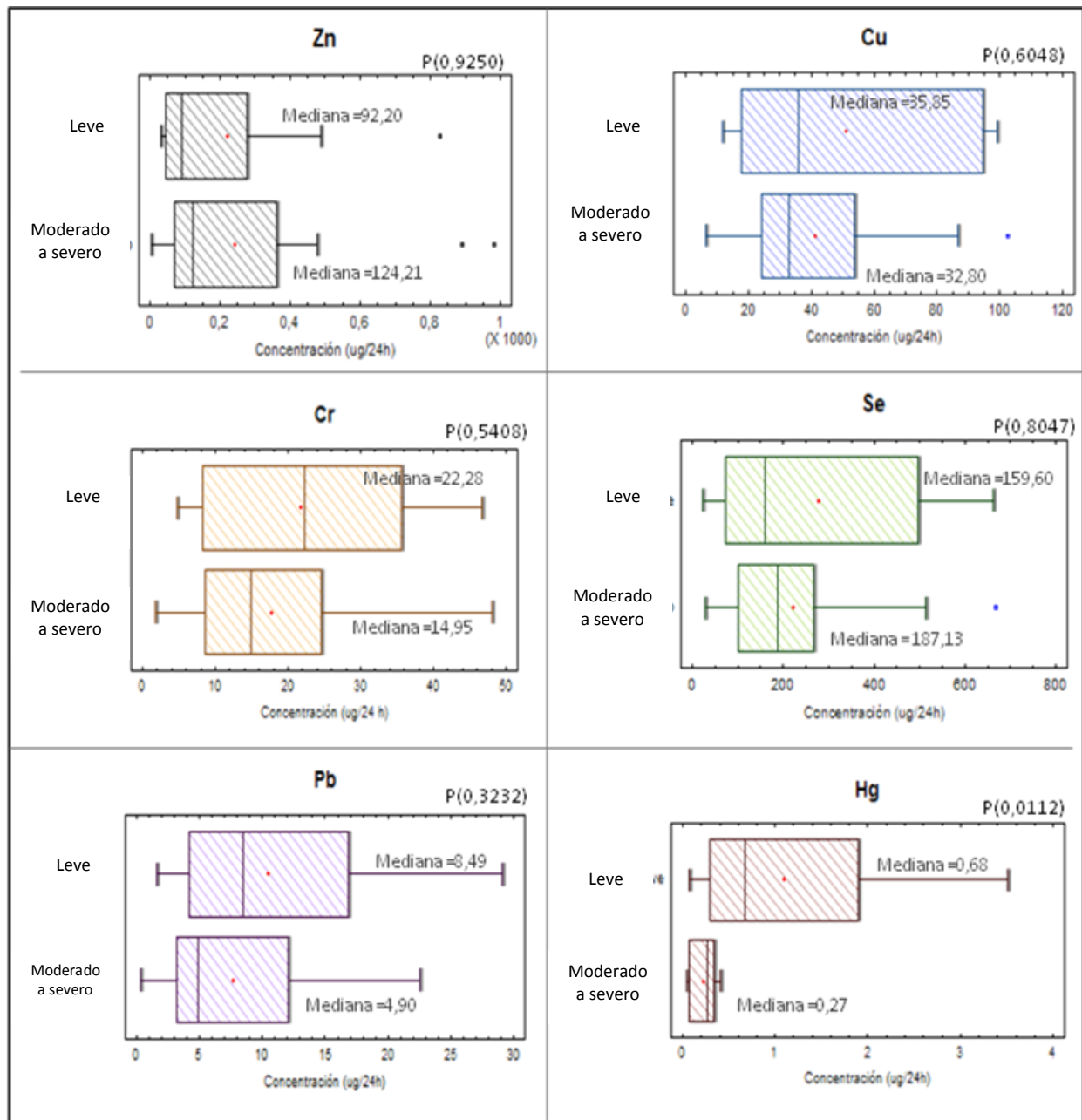


Figura 23. Diagrama de cajas y bigotes de los datos obtenidos para muestras de orina 24 horas de niños con Síndrome de Espectro autista, según el nivel de la enfermedad.

II.5.1.2 Distribución de las concentraciones de elementos traza en muestras de orina de niños de espectro autista, en función de la dieta.

La nutrición es un factor íntimamente asociado al desarrollo no sólo del autismo, sino a múltiples enfermedades, debido a que cada elemento esencial 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 fundamental en el suministro de cantidades adecuadas de los mismos.

Sin embargo, en el caso de los niños autistas la situación es más complicada, ya que como se ha mencionado en párrafos anteriores, se caracterizan por poseer un sistema gastrointestinal muy sensible, que favorece la aparición de alergias alimentarias, intolerancia hacia alimentos a base de trigo, lactosa, entre otros.

En base a tal condición, uno de los tratamientos que se han utilizado ampliamente para controlar los rasgos del autismo, ha sido en base a dietas libres de gluten y caseína (derivados de trigo y de lácteos, respectivamente). En efecto, la gran mayoría del grupo de niños autistas que conforman la muestra de este estudio, están siendo tratados con esta o ninguna dieta. Por tal motivo, se procedió al establecimiento de comparaciones entre ellos, con la finalidad de verificar si aportan o no algún tipo de beneficio.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 24, donde puede notarse (según estadísticos P) que la excreción urinaria de los elementos objeto de análisis es similar, independientemente de si siguen o no un régimen alimenticio libre de gluten y caseína.

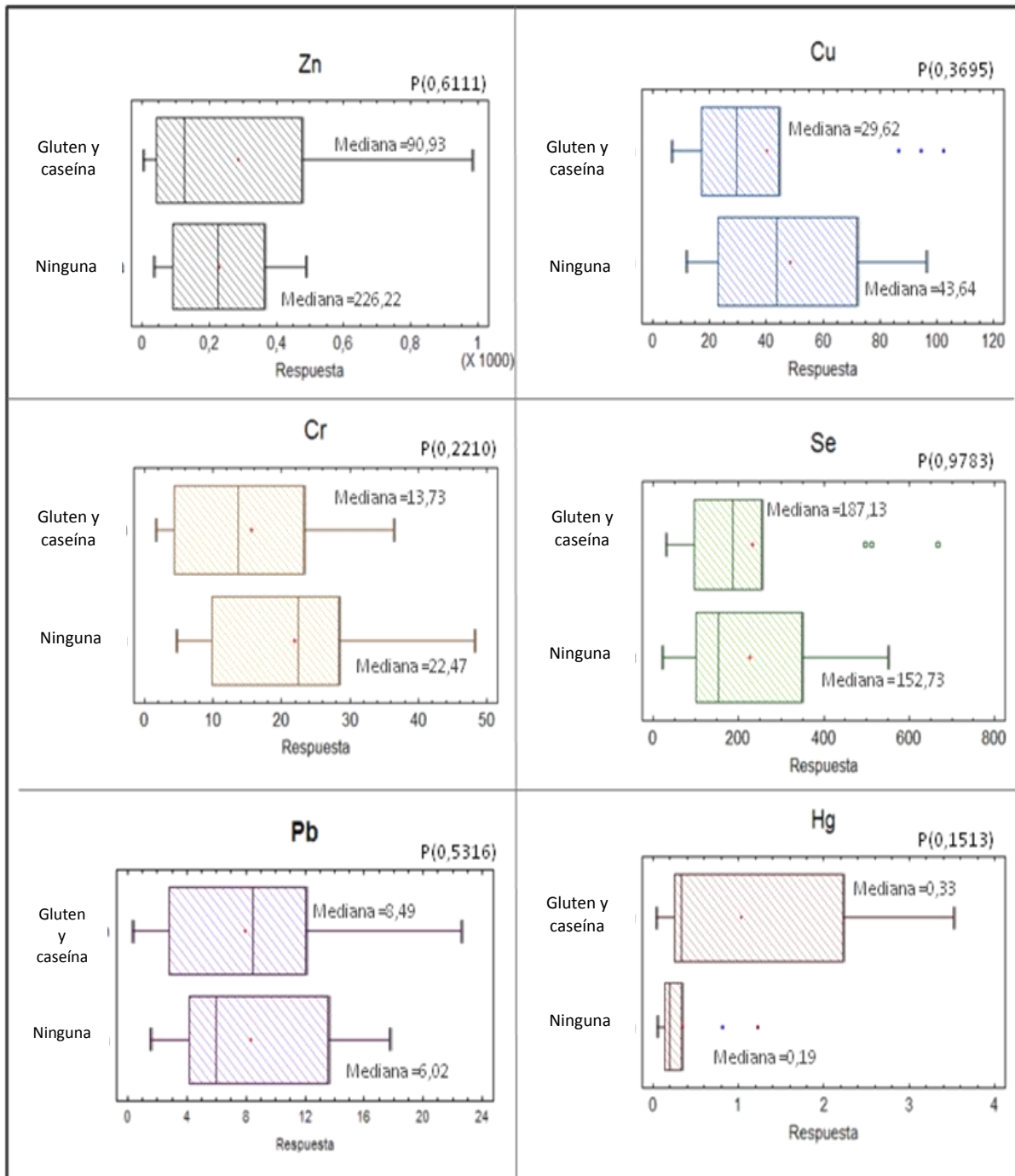


Figura 24. Diagrama de cajas y bigotes de los datos obtenidos para muestras de orina 24 horas de niños de Espectro Autista, según la dieta.

II.5.2 Análisis de elementos traza en muestras de cabello de niños de espectro autista.

Las concentraciones obtenidas para los metales Zn, Cu, Pb, Cd y Hg, en las muestras de cabello, pertenecientes a una población de 29 a 31 niños con Síndrome de Espectro Autista, se representan en la figura 25 y se indican en el apéndice 3 de este estudio.

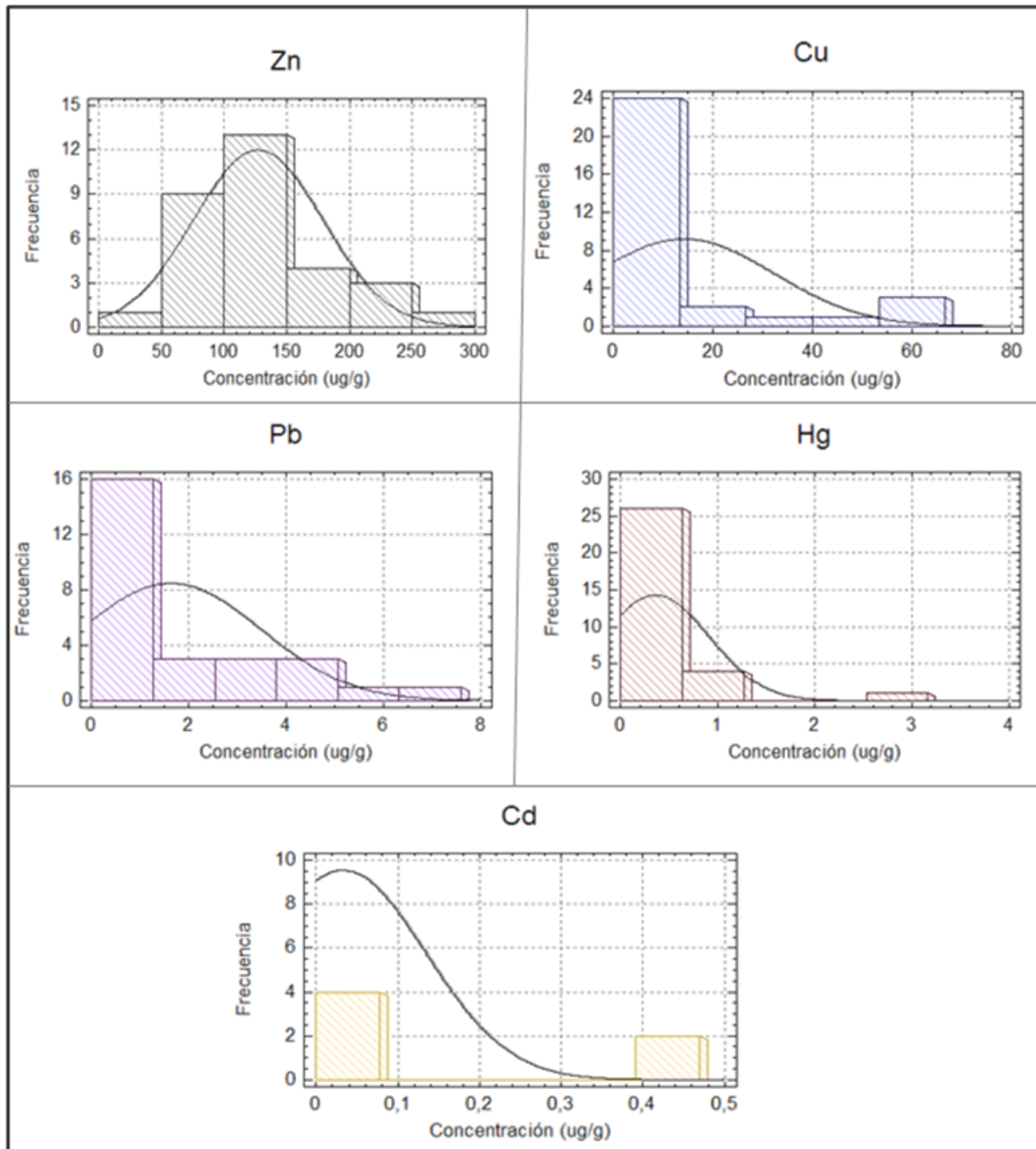


Figura 25. Distribución de concentraciones de Zn, Cu, Pb, Cd y Hg (mercurio total), en muestras de cabello de niños con Síndrome de Espectro Autista.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la mediana derivada de los mismos y en base a los valores de referencia para cada elemento (ver tabla XIII), puede decirse que la distribución de concentraciones del Zn tiende a ser de normal a baja, mientras que para el Cu, la tendencia es muy variable, sin embargo, las concentraciones más frecuentes (mediana) se mantienen dentro del intervalo de concentraciones de referencia.

Por su parte, el contenido de metales tóxicos como Pb, Cd y Hg, se mantiene siempre por debajo de los valores máximos permisibles para este tipo de muestras, excepto en muy pocos niños que presentaron valores de Pb y Cd por encima de lo “normal” (considerando como normal aquellos datos que se encuentran dentro de los intervalos reportados para cada elemento), lo cual es totalmente razonable, ya que son justamente los infantes con padres fumadores y, en consecuencia, mayormente expuestos a tales elementos.

Los resultados obtenidos para este tejido son consecuentes con los datos adquiridos a partir del análisis de las muestras de orina de la población objeto de estudio, por lo tanto, sirven de soporte para las propuestas que se han ido manejando en el desarrollo de las discusiones de este trabajo.

Asimismo, se observó que nuevamente las concentraciones determinadas presentaron una dispersión elevada, reflejada por la desviación estándar obtenida para cada elemento (ver tabla XIII).

Tabla XIII. Concentraciones de los elementos objeto de estudio, obtenidas para muestras de cabello de niños de Espectro Autista.

Elemento	Intervalo de concentraciones grupo autista (µg/g)	Intervalo de concentraciones grupo control (µg/g)	Mediana Obtenida para grupo autista (µg/g)	Mediana Obtenida para grupo control (µg/g)	Intervalo de concentraciones de referencia* (µg/g)
Zn	36,96 – 259,69	75,60 – 144,92	120,50 ± 51,65	110,20 ± 23,93	140 – 220
Cu	3,51 – 62,84	3,35 – 6,89	5,70 ± 18,21	4,84 ± 1,16	11 – 37
Cr	ND	ND	ND	ND	0,40 – 0,65
Se	ND	ND	ND	ND	0,55 – 1,1
Pb	<LD – 6,53	<LD – 4,26	0,78 ± 1,77	1,43 ± 1,50	< 0,60
Hg	0,0008 – 2,9727	0,13 – 0,84	0,1771 ± 0,5480	0,50 ± 0,24	< 0,80
Cd	< LD – 0,42	< LD	<LD	ND	< 0,050

ND: no detectable , < LD: menor al límite de detección de la técnica

Del mismo modo, se analizaron muestras de cabello de 8 niños sanos (grupo control), para los cuales la distribución de concentraciones de los elementos esenciales como Zn y Cu, mostraron medianas que se encuentran por debajo de los valores reportados en el intervalo de referencia (ver tabla XIII).

Por su parte, las concentraciones correspondientes a los elementos tóxicos como Pb, Cd y Hg, se mantuvieron en su mayoría por debajo de los valores máximos permisibles para este tipo de muestras.

Si se observan con detenimiento los datos obtenidos para niños sanos y con Síndrome de Espectro Autista que se señalan en la figura 26, podrá notarse que en ambos casos los valores de la mediana de las concentraciones de Zn y Cu (elementos esenciales) son menores a los reportados. Tal hallazgo indica la probabilidad de que el problema radique en la alimentación de los niños venezolanos, cuyo aporte de nutrientes esenciales no está satisfaciendo los requerimientos necesarios o, simplemente a que los valores normales de estos metales oscilan entre los encontrados, para niños venezolanos.

Por lo tanto, de asumirse el factor “nutrición” como uno de los posibles desencadenantes del autismo, el hecho de que no afecta a todos los niños sería una inquietud razonable, sin embargo, se sabe que no todos los organismos reaccionan igual ante estímulos semejantes, de manera tal que es muy probable que el autismo no sea más que una condición “genética” que aumenta la vulnerabilidad del individuo y, éste al encontrarse expuesto a déficits de elementos esenciales, agresiones ambientales e incluso factores “anímicos” desfavorables, puede llegar a desarrollar el síndrome.

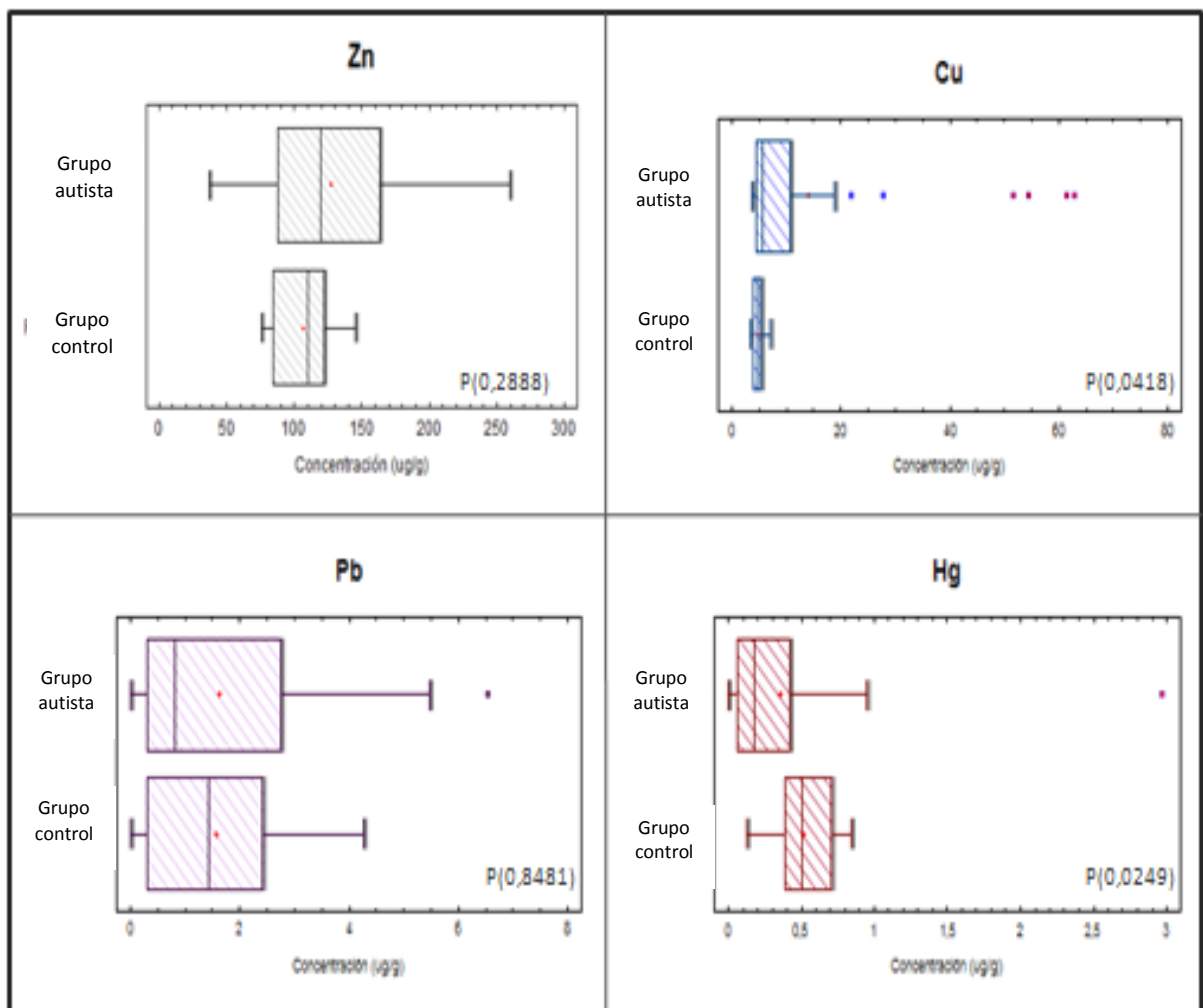


Figura 26. Diagrama de cajas y bigotes de los datos obtenidos para muestras de cabello de niños de Espectro Autistas y niños sanos.

Otra circunstancia que puede generar confusión, es el hecho de que los resultados obtenidos para Zn y Cu hayan sido más favorables en orina que en cabello. Esta situación es completamente normal, considerando que cada espécimen, de sangre, de orina o de cabello provee información específica y algo limitada. Sin embargo, con los resultados de las pruebas de varios especímenes corporales, puede recibirse una visión más amplia con relación a los procesos metabólicos^[109]. Esto quiere decir que ninguna prueba de laboratorio es superior a otra, cada prueba tiene validez. No obstante, los resultados obtenidos indican que para efectos de la determinación de la carga metálica en seres humanos, la orina proporciona más información que el cabello.

En el caso del Hg, se observa la misma tendencia que en orina; su liberación es menor en niños de Espectro Autista ($P=0,0249$). Este resultado se asemeja con el obtenido por Adams (2004) ^[99], quien también estableció comparaciones entre los niveles de Hg de muestras de cabello de niños con autismo versus un grupo control, obteniendo los datos que se indican en la figura 27.

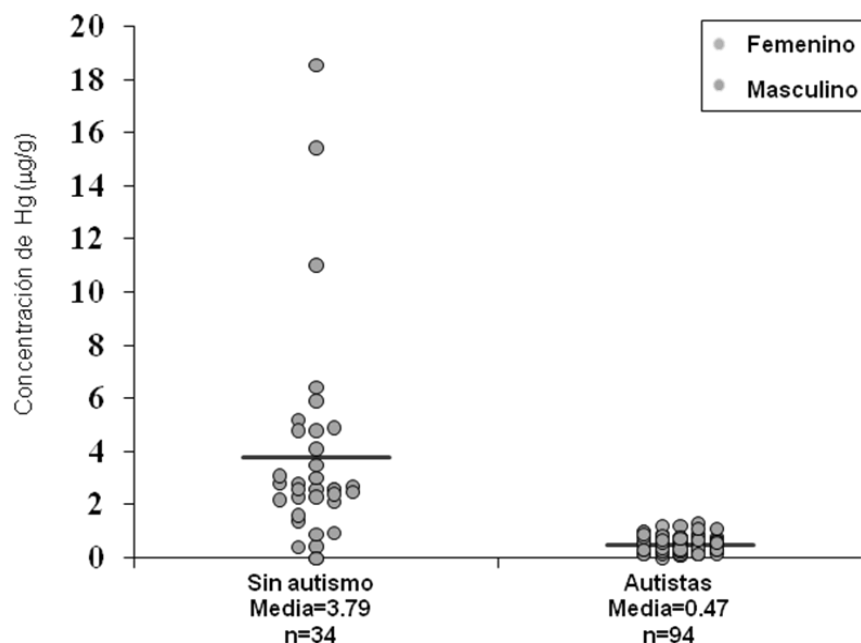


Figura 27. Comparación de los niveles de Hg en cabello obtenidos por Adams, para niños con autismo y niños sanos.

II.5.2.1 Distribución de las concentraciones de elementos traza en muestras de cabello de niños de espectro autista, en función del nivel de autismo.

La agrupación de los datos obtenidos en función del nivel de autismo de la población objeto de estudio, arrojó los resultados que se muestran en la figura 28. Pudiéndose notar, que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de los elementos al incrementar la severidad del Síndrome.

Este resultado difiere de las observaciones obtenidas por Adams^[99] para el análisis de Hg, realizado también en muestras de cabello de niños de Espectro Autista, quien halló, tal como lo indica la figura 29, que a medida que disminuye la severidad del autismo, también se reduce la retención del metal en el cuerpo del infante, tal como lo indicaron los resultados de Hg en orina 24 horas analizadas en este estudio.

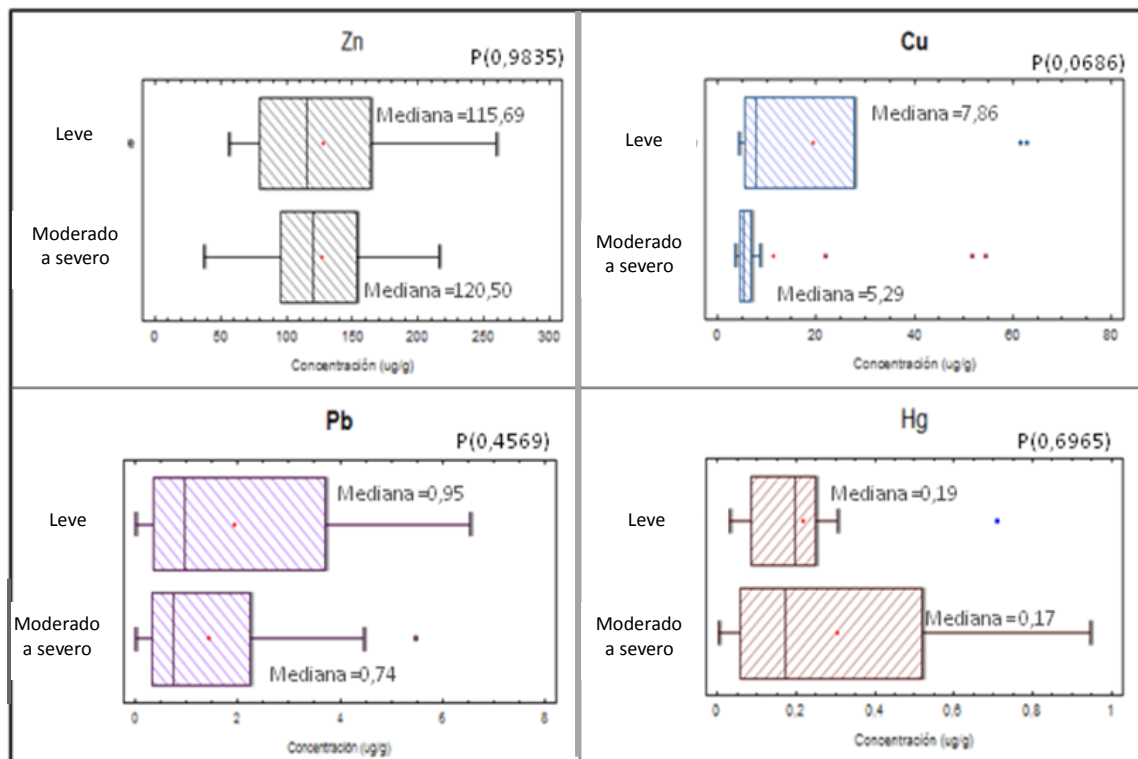


Figura 28. Diagrama de cajas y bigotes obtenidos para muestras de cabello de niños con Síndrome de Espectro autista, según la severidad de la enfermedad.

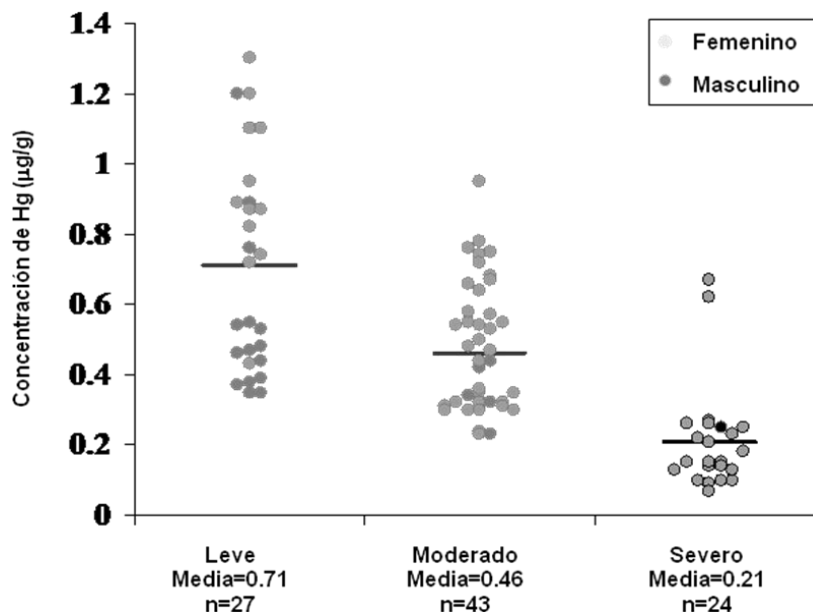


Figura 29. Comparación de los niveles de Hg en cabello, según la severidad de la enfermedad^[99].

II.5.2.2 Distribución de las concentraciones de elementos traza en muestras de cabello de niños de espectro autista, en función de la dieta.

Los resultados obtenidos se exponen en la figura 30, donde puede apreciarse nuevamente, que no existen diferencias significativas entre las concentraciones de los elementos de niños autista con dietas libres de gluten y caseína y los que no siguen ninguna dieta específica.

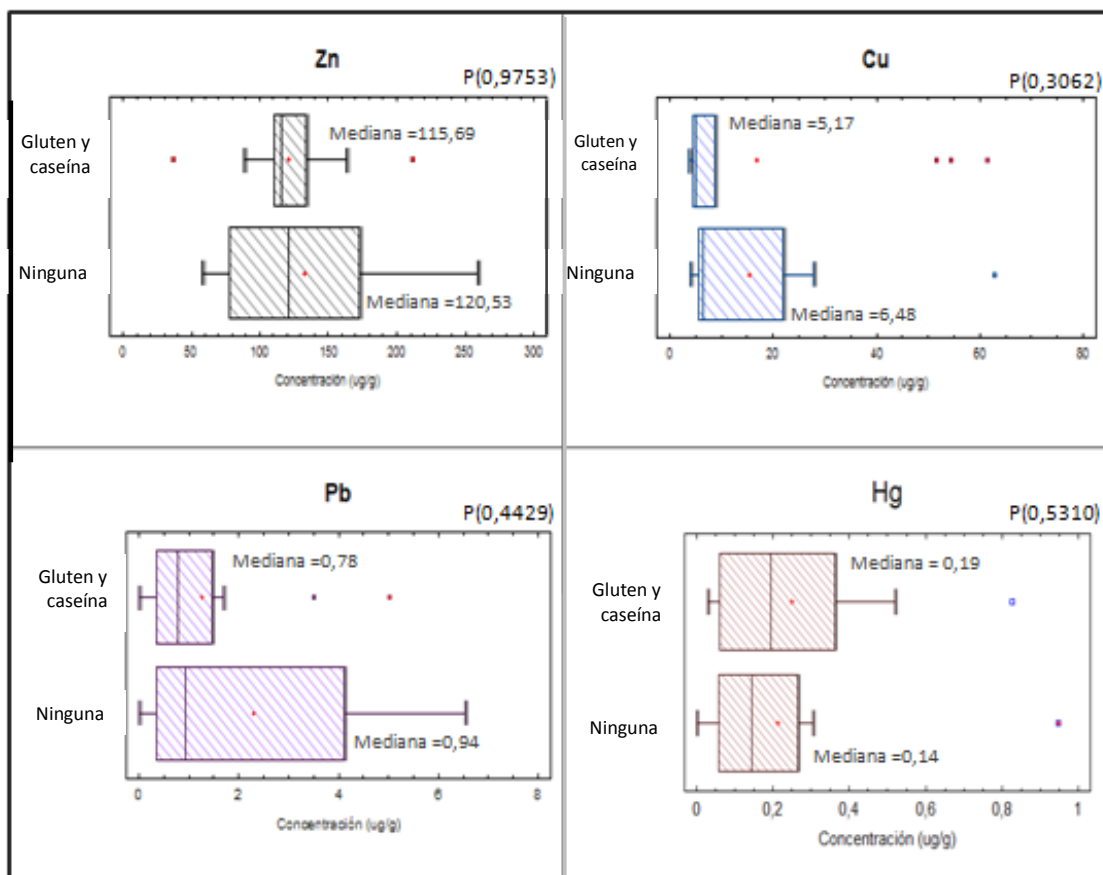


Figura 30. Diagrama de cajas y bigotes de los datos obtenidos para muestras de cabello de niños de Espectro Autista, según la dieta.

VI. Conclusiones

- Sólo puede removerse aproximadamente el 80% del contenido de Cd y mercurio de origen exógeno de las muestras de cabello. Por lo tanto, la determinación de los mismos a través de la aplicación de las técnicas y metodologías de análisis empleados en este estudio, suponen un error adicional, cuya magnificación dependerá del grado de exposición del individuo a estos elementos.
- El empleo de material de plástico para la digestión de muestras de cabellos no afecta la determinación de mercurio en estas.
- Las orina suministró mayor información que el cabello, debido a que admitió la determinación de un mayor número de elementos por ICP-OES y favoreció el establecimiento de correlaciones metal-metal.
- El cabello como indicador biológico acumulador, puede suministra un medio conveniente y preciso para medir la exposición crónica a sustancias tóxicas.
- El contenido metálico en muestras de cabello y orina de niños de Espectro Autista no mostró diferencias significativas respecto al grupo control y, puede considerarse que ambos grupos presentan niveles normales de los elementos analizados en este estudio.
- La excreción de Hg es mayor en niños sanos, que en niños con Síndrome de Espectro Autista y, a medida que disminuye la severidad del autismo, asciende la liberación de Hg.

- La población de análisis no presentó niveles elevados de elementos tóxicos (Hg, Pb y Cd) que puedan indicar algún tipo de intoxicación crónica por parte de los mismos.

VII. Recomendaciones

- Fomentar y apoyar este tipo de estudios, en pro de contribuir al desarrollo de análisis propios, que constituyan herramientas útiles tanto para la elaboración de diagnósticos de médicos venezolanos, como para el establecimiento de teorías que describan el desarrollo de esta u otras enfermedades.
- Extender este estudio a poblaciones más grandes de niños de Espectro Autista, en las que se incluya a sus progenitores, e incluso puedan analizarse un mayor número de elementos (entre ellos yodo y litio) y, de ser posible, otros indicadores biológicos (como la sangre). Para que así, puedan establecerse tendencias más contundentes respecto a las posibles relaciones metal-autismo.
- Realizar investigaciones más amplias, donde puedan estudiarse de manera conjunta todos los factores que se considera pueden estar influyendo en el desarrollo del Síndrome de Espectro Autista, de manera tal, que se logre definir cuáles teorías son descartables o no, y en base a ello establecer modelos que puedan describir la etiología de la enfermedad.

VIII. Referencias Bibliográficas

- [1] Villaroel, J. (2004). **“Elementos Biogénicos (Zn, Cu, Fe y Mg) en pelo, uñas y suero sanguíneo en la mujer gestante, en pelo y uñas de recién nacidos”**. Trabajo de grado para optar al título de Doctor en Química Analítica. Facultad de Ciencias. Universidad de los Andes. Mérida.
- [2] Mahan, L. y Scout-Stump, S. (1996). **“Nutrición y Dietoterapia de Krause”**. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana. México. Capítulo 5. pp. 119-161.
- [3] Bohinski, R. (1978). **“Bioquímica”**. Fondo Educativo Interamericano Editores. S.A. México. Capítulo 3. pp. 72-76.
- [4] Campbell, J. (2001). **“Lifestyle, minerals and health”**. Medical Hypotheses. Vol. 57. pp 521-531.
- [5] Maraima, M. (2006). **“Determinación de silicio mediante la Espectrometría de emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES)”**. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- [6] Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo (INST).(1984). **“Nota Técnica de Prevención 109: Valores límite biológicos para el control de exposición a metales”**. Ministerio de Trabajo y asuntos Sociales. INSHT. [On-line]. Disponible en: http://www.mtas.es/insht/ntp/ntp_109.htm
- [7] González Revaldería J.(1998) **“Análisis de Elementos traza: aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos”**. Cocho JA, Escanero JF, González de Buitrago JM. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular 1998. Pp 101-112
- [8] Organización Munidal de la Salud(1991). **“Inorganic Mercury”**. Environmental Health Criteria 118. Ginebra.

- [9] Cornelis R, Heinzow B, Herber RF, Christesen JM, Poulsen OM, Sabbioni E, TempletonDM, Thomassen Y, Vahter M, Vesterberg O. (1996). **"Sample collection guidelines for trace elements in blood and urine"**. J Trace Elements Med Biol 10(2):103-127.
- [10] Wilhelm M, Ohnesorge FK, Lombeck I, Hafner D. (1989) **"Uptake of aluminium, cadmium, copper, lead and zinc by human scalp hair and elution of the adsorbed metals"**. Journal of Analytical Toxicology 13:17-21.
- [11] Organización Mundial de la Salud. (1990). **"Methylmercury"**. Environmental Health Criteria 101. Ginebra.
- [12] González, J. (1998). **"Análisis de Elementos traza: aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos"**. Cocho JA, Escanero JF, González de Buitrago JM. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular 1998. Pp 101-112
- [13] Rodríguez E. and Díaz C. (1995). **"Iron, Copper and Zinc levels in urine: Relationship to various individual factors"**. J Trace Elements Med Biol. 9:200-209
- [14] Abdulla M. and Chmielnicka J.(1989) **"New aspects on the distribution and metabolism of essential trace elements after dietary exposure to toxic metals"**. Biol. Trace Elem Res 23:25-53
- [15] Staessen J., Lauwerys, R., et. Al. (1994). **"Renal function and historical environmental cadmium pollution from zinc smelters"**. Lancet 343:1523-1527
- [16] Osman K, Schütz A, Akesson B, Maciag A, Vahter M. (1998). **"Interactions between essential and toxic elements in lead exposed children in Katowice, Poland"**. Clinical Biochemistry. 31(8):657- 665).
- [17] Miller G., Massaro T. and Massaro, E. (1990). **"Interactions between lead and essential elements: a review"**. Neurotoxicology 11(1):99-119

- [18] Skoczynska A, Smolik R, Milian A. (1994). **"The effect of combined exposure to lead and cadmium on the concentration of zinc and copper in rat tissues"**. Int J Occup Med Environ Health 7(1):41-49
- [19] Satarug S, Haswell-Elkins MR, Moore MR.(2000). **"Safe levels of cadmium intake to prevent renal toxicity in human subjects"**. British Journal of Nutrition 84:791-802.
- [20] Falchuk KH.(1998). **"Alteraciones de los oligoelementos"**. En: Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL. Harrison: Principios de Medicina Interna 14ª Edición. Ed. McGraw-Hill B Interamericana de España. pp 556-559.
- [21] Organización Mundial de la Salud.(1995) **"Inorganic Lead"**. Environmental Health Criteria 165. Ginebra.
- [22] Elsenhans B, Strugala GJ, Schafer SG. (1997) **"Small-intestinal absorption of cadmium and the significance of mucosal metallothionein"**. Human and Experimental Toxicology 16:429-434
- [23] Bottomley S. (1995) **"Anemias sideroblásticas"**. En: Wintrobe. Hematología Clínica. Editorial Intermédica. Buenos Aires. 90ª Edición. Pág. 750
- [24] Organización Mundial de la Salud (OMS).(1992). **"Cadmium"**. Environmental Health Criteria 134. Ginebra.
- [25] Pesce A., Kaplan, L. (1990). **"Química Clínica Métodos"**. Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires.
- [26] Occupational Safety & Health Administration (OSHA). (1992). US Department of Labor. **OSHA Regulations, Standards - 29CFR, Nonmandatory Protocol for Biological Monitoring**. [On-line]. Disponible en: http://www.osha-slc.gov/OshStd_data/1910_APP_F.html.

- [27] Lorscheider, F., Vimy, M. and Summers, A. (1995) **“Mercury exposure from “silver” tooth fillings:emerging evidence questions a traditional dental paradigm”**. Faseb J 9:504-508.
- [28] Lindh U., Danersund, A. and Lindvall, A.(1996). **“Selenium protection against toxicity from cadmium and mercury studied at the cellular level”**. Cellular and Molecular Biology 42(1):39-48.
- [29] Klaassen C., Liu, J. and Choudhuri, S (1999). **“Metallothionein: An intracellular protein to protect against cadmium toxicity**. Annu Rev Pharmacol Toxicol 39:267-294
- [30] Klaassen CD, Liu J.(1998) **“Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury”**. Enviromental Health Perspectives 106(Supplement I):297-300.
- [31] Karin M, Slater EP, Herschman HR. (1981). **“Regulation of metallothionein synthesis in HeLa cells by heavy metals and glucocorticoids”**. J cell Physiol 106:63-74
- [32] Nordberg M, Nordberg G. (2000). **“Toxicological aspects of metallothionein”**. Cellular and Molecular Biology 46(2):451-463.
- [33] Ladrón, J. and Moya, V. (1995). Págs. 169-178. **“Toxicología Médica”**. Editorial Interamericana de España-McGraw-Hill. Págs. 169-178
- [34] Brzoska MM, Moniuszko-Jakoniuk J.”(2001). **Interactions between cadmium and zinc in the organism**. Food Chem Toxicol 39(10):967-980
- [35] Asano S, Eto K, Kurisaki E, Gunji H, Hiraiwa K, Sato M, Sato H, Hasuike M, Hagiwara N, Wasaka H.(2000) **Acute inorganic mercury vapor inhalation poisoning**. Pathol Int 50(3):169-174

- [36] Ganther HE, Goudie C, Sunde ML, Kopecky MJ, Wagner P, Hoekstra WG(1972) **Selenium: relation to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna.** Science 175:1122-1124.
- [37] Ganther HE. (1978) **Modification of methylmercury toxicity and metabolism by selenium and vitamin E: possible mechanisms.** Environ Health Perspect 25:71-76.
- [38] Soria ML, Repetto M.(1995) **Estado actual de la toxicología del mercurio.** En: Toxicología avanzada. Repetto M. Ediciones Dáiz de Santos S.A.. Madrid, España.
- [39] Glynn AW, Lind Y.(1995) **Effect of long-term sodium selenite supplementation on levels and distribution of mercury in blood, brain and kidneys of methyl-exposed female mice.** Pharmacol Toxicol 77(1):41-47.
- [40] Margoshes M, Vallee BL.(1957) **A cadmium kidney protein from equine kidney cortex.** J Am Chem Soc 79:4813-4814 (1957)
- [41] OMS. **Copper.**(1998) Environmental Health Criteria 200. Ginebra. Organización Mundial de la Salud.
- [42] Sallsten G, Barregard L.(1997) **Urinary excretion of mercury, copper and zinc in subjects exposed to mercury vapour.** Biometals 10(4):357-361.
- [43] García Tasende MS, Casas S.(1998) **Química de los metales.** En: Análisis de Elementos traza: aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos. Cocho JA, Escanero JF, González de Buitrago JM. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Pp29-66
- [44] Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasak M.(2001) **Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system.** Brain Res Bull 55(2):133-145
- [45] Tandon SK, Khandelwal S, Jain VK, Mathur N.(1993) **Influence of dietary iron deficiency on acute metal intoxication.** Biometals 6(2):133-138

- [46] DiSilvestro RA. (2000) **Zinc in relation to diabetes and oxidative disease**. J Nutr 130(5S Suppl):1509S-1511S.
- [47] Skoog, D. (2001). **"Análisis Instrumental"**. Quinta Edición. Editorial McGraw-Hill. México. Capítulo 10. pp. 245-261.
- [48] Chirinos, J. y Márquez, G. (2006). **"Introducción a la Espectrometría de emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP OES)"**. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- [49] Skoog DA, Leary JJ.(1993) **Espectroscopía de emisión basada en la atomización con plasma, arco o chispa**. En: Skoog DA, Leary JJ. **Análisis Instrumental 4^a Edición**. McGraw-Hill/Interamericana de España S.A. pp 272-295
- [50] Cocho JA.(1998) **Análisis de elementos traza**. En: **Análisis de Elementos traza: aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos**. Cocho JA, Escanero JF, González de Buitrago JM. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Pp 113-141
- [51] Occupational Safety & Health Administration (OSHA). US Department of Labor. (1991). **Analytical method ID-140 Mercury vapor in workplace atmospheres**. [On-line]. Disponible en: <http://www.osha.gov/dts/sltc/methods/inorganic/id140/id140.html>
- [52] Boening DW.(2000) **Ecological effects, transport and fate of mercury: a general review**. Chemosphere 40:1335-135.
- [53] Ferrara R, Maserti BE, Andersson M, Edner H, Ragnarson P, Svanberg S, Hernandez A.(1998). **Atmospheric mercury concentrations and fluxes in the Almadén district (Spain)**. Atmospheric Environment 32(22):3897-3904.
- [54] Litovitz T, Schmitz BF. (1992). **Ingestion of cylindrical and button batteries: an analysis of 2382 cases**. Pediatrics 89:747-757.

- [55] Lauwerys RR. (1994). **Principales sustancias inorgánicas y organometálicas: Mercurio**. En Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales. Lauwerys RR. Ed Masson. pp 150-162.
- [56] Campbell BG.(1999) **Mercury, cadmium and arsenic: Toxicology and laboratory investigation**. Pathology 31:17-22.
- [57] U.S. Environmental Protection Agency (EPA) (1994). Office of Air Quality Planning and Standards. **Mercury and Compounds**. [On-line]. Disponible en: <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/mercury.html>
- [58] Chang SB, Siew C, Gruninger SE.(1992) **Factors affecting blood mercury concentrations in practicing dentists**. J Dent Res 71(1):66-74).
- [59] Drexler H, Schaller KH.(1998) **The mercury concentration in breast milk resulting from amalgam fillings and dietary habits**. Environ Res 77(2):124-129.
- [60] Airey D. (1983). **Total mercury concentrations in human hair from countries in relation to fish consumption and location**. The Science of the Total Environment 31:157-180.
- [61] Campbell BG.(1999). **Mercury, cadmium and arsenic: Toxicology and laboratory investigation**. Pathology 31:17-22.
- [62] López Artíguez M, Repetto M. (1995) **Estado actual de la toxicología del cadmio**. En: Toxicología avanzada. Repetto M. Ediciones Díaz de Santos S.A.. Madrid.
- [63] Hu H.(2000). **Exposure to metals**. Prim Care 27(4):983-996.
- [64] Friberg L, Piscator M, Nordberg G, Kjellstrom T(1974). **Cadmium in the environment**. 2nd Ed. Cleveland, Ohio, CRC Press. Pag 248.

- [65] Elinder CG, Kjellstrom T, Lind B, Linnman L, Piscator M, Sundstedt K (1983). **Cadmium exposure from smoking cigarettes: variations with time and country where purchased.** Environ Res 32:220-227.

- [66] Turnlund, J (1994). **Copper.** En: Shils ME, Olson JA, Shike M. **Modern nutrition in health and disease.** Lea & Febiger. Malvern.EE.UU. 8ª Edición. (pp 231-241

- [67] Pesce AJ, Kaplan LA (1990). Apéndices. En: Pesce AJ, Kaplan LA. **Química Clínica Métodos.** Editorial Médica Panamericana S.A. Buenos Aires.

- [68] Fernández MD. (1998) **Cobre.** En: Análisis de Elementos traza: aspectos bioquímicos, analíticos y clínicos. Cocho JA, Escanero JF, González de Buitrago JM. Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular. Pp 223-259

- [69] Kok FJ, Van Duijn CM, Hofman A, Van der Voet GB, De Wolff FA, Paays CH, Valkenburg HA (1988). **Serum copper and zinc and the risk of death from cancer and cardiovascular disease.** Am J Epidemiol 128(2):352-359.

- [70] Lee GR (1994). **Factores nutricionales en la producción y función de los eritrocitos.** En: Wintrobe. Hematología Clínica. Editorial Intermédica. Buenos Aires. 9ª Edición. Págs. 153-155

- [71] Villanueva Cañadas E(1998). **Plomo.** En: Medicina Legal y Toxicología. Gisbert Calabuig JA. Masson SA, Barcelona, 5ª Edición.

- [72] Marqués Marqués F. (1993) **Plomo: Criterios toxicológicos actuales para la vigilancia médica de trabajadores expuestos.** Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. Madrid.

- [73] Oldfield JE (1999). **Selenium world atlas.** Ed. Selenium-Tellurium Development Association (STDA). Grimbergen. Belgium.

- [74] Neve J, Vertongen F, Molle L.(1985) **Selenium deficiency.** Clin Endocrinol Metab 14:629-651

- [75] OMS. **Selenium**. (1997) En: Aspects sanitaires et nutritionnels des oligoelements et des elements en traces. Ginebra. Organización Mundial de la Salud. (pp 105-122)
- [76] Panel on Dietary Antioxidants and related compounds. (2000). "**Food and Nutrition Board**". Institute of Medicine USA. Dietary Reference Intakes for Vitamin C, Vitamin E, Selenium and carotenoids. National Academy Press. Washington DC.
- [77] Peraza MA, Ayala-Fierro F, Barber DS, Casarez E, Rael LT.(1998) "**Effects of micronutrients on metal toxicity**". Environmental Health Perspectives 106(suppl I): 203-216.
- [78] Ip C, Hayes C, Budnick RM, Ganther HE. (1991) **Chemical form of selenium, critical metabolites, and cancer prevention**. Cancer Res 51:595-600
- [79] Rayman MP.(2000) **The importance of selenium to human health**. The Lancet 356:233-241
- [80] Oster O, Prellwitz W.(1990) Selenium and cardiovascular disease. Biol Trace Elem Res. 24(2):91-103.
- [81] Lombeck I, Menzel H, Frosch D. (1987) **Acute selenium poisoning of a 2-year old child**. Eur J Pediatr 146:308-312
- [82] Sheehan TMT, Halls DJ.(1999) **Measurement of selenium in clinical specimens**. Ann Clin Biochem 36:301-315
- [83] García Ariño C.(1993) "**Zinc**". En: Medicina del Trabajo. Martí Mercadal JA, Desoille H. Editorial Masson 2ª Edición. (pp 320-323)
- [84] Ladrón de Guevara J, Moya Pueyo V./1995) "**Cinc y sus compuestos**". En: Toxicología Médica. Ladrón de Guevara J, Moya Pueyo V. Editorial Interamericana de España-McGraw-Hill.(1995) pp 157-160.

- [85] Salgueiro J, Zubillaga M, Lysionek A, Sarabia MI, Calmanovici G, Caro R, De Paoli T, Hager A, Weill R, Boccio J(1999). **“Zinc: concepts on an essential micronutrient”**. Acat Physiol Pharmacol Ther Latinoam 49(1):1-12
- [86] Prasad AS.(1985) **“Clinical and biochemical manifestations of zinc deficiency in huma subjects”**. J Am Coll Nutr 4:65-72
- [87] OMS.(1997) **“Zinc”**. En: Aspects sanitaires et nutritionnels des oligoelements et des elements entraces. Ginebra. Organización Mundial de la Salud. (pp 72-104)
- [88] Powell SR. (2000) **“The antioxidant properties of zinc”**. J Nutr 130(5S Suppl):1447S-1454S.
- [89] Rapin, I. (2001) **An 8-year-Old boy with..** National Institute of Mental Health (NIMH). JAMA. 285: 1749-1757.
- [90] **Manual Estadístico y Diagnóstico de los Trastornos Mentales**. Cuarta Edición (DSM-IV), 1994.
- [91] Lathe, R. (2006). **Heavy metals may be implicated in autism**. New Scientist Magazine, 2553. Page 21.
- [92] 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.
- [93] 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. [On-line]. Disponible en: <http://www.autism.com/medical/research/adams1.htm>
- [94] 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.

- [95] Carrión, N., Caetano, M., Guillén, N. Y Avendaño, O. (1994). **“Determination of Mercury in Biological Materials by Ultrasonic-Vibrating Mineralization and cold vapor Atomic Absorption Spectroscopy”**. Third Rio Symposium of Atomic Spectrometry . Venezuela. pp. 1-9.
- [96] Hernández, M. (2001). **“Estudio de los niveles de mercurio en profesionales expuestos del área en odontología”**. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- [97] Pérez, B. (2007). **“Determinación de una metodología para la determinación de elementos traza en cabello por espectroscopia de emision optica con plasma inductivamente acoplado”**. Trabajo de grado para optar al título de Licenciado en Química. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- [98] 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.
- [99] Adams, J. (2004). A Review of the **Autism-Mercury Connection**, Conference Proceedings of the Annual Meeting of the Autism Society of America.
- [100] 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.
- [101] Faber, S., Zinn, G., Kern, J. y Skip, H. (2009). **The plasma zinc/serum copper ratio as a biomarker in children with autism spectrum disorders**. Biomarkers, 11:1-10.
- [102] The Agency for Toxic Substances and Disease Registry Division of Health Assessment and Consultation and Division of Health Education and Promotion

- (2001). **Hair Analysis Panel Discussion: Exploring the state of the science.** Eastern Research Group. Atlanta, Georgia.
- [103] Perkin Elmer. **FIMS-100** [On-line]. Disponible en: <http://las.perkinelmer.com/Catalog/ProductInfoPage.htm?ProductID=B0509550>. [Fecha de consulta: Octubre de 2008].
- [104] Walsh, W.J., Usman, A., and Tarpey, J.; **Disordered Metal Metabolism In a Large Autism Population**, Proceedings of the Amer. Psych. Assn.; New Research: Abstract NR109, New Orleans, May, 2001.
- [105] Walsh, W.J., Usman, A., Tarpey, J., and Kelly, T.; **Metallothionein and Autism**, Second Edition, Pfeiffer Treatment Center, Naperville, IL (2002).
- [106] Díaz, D (2005). **Contribución al desarrollo de métodos de análisis para la especiación de compuestos mercuriales en tejido de peces.** Tesis de Maestría, Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Caracas.
- [107] Lajunen, H. (1992). **Spectrochemical Analysis by Atomic Absorption and Emission** . Cambridge: Royal Society of Chemistry. Págs. 117-125.
- [108] Skoog, D., Holler, F. Y Nieman, T. (2001). **Principios de Análisis Instrumental**. 5^{ta} edición. McGRAW-HILL. Madrid, España. Págs. 226 -227.
- [109] Solórzano, H (2002). **La validez científica del análisis mineral del pelo.** Terapia Bioquímica Nutricional. Universidad de Guadalajara. [On-line]. Disponible en: <http://www.hector.solorzano.com/articulos/pelo.html>
- [110] FAO/WHO (2002). **Human Vitamin and Mineral Requirements**. Report of an expert consultation, Bangkok Thailand. Chapter 15 Selenium. [On-line]. Disponible en: <http://www.fao.org/DOCREP/004/Y2809E/y2809e0l.htm#bm21.1>

Apéndices

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

Muestras	Zn	Cu	Cr	Se	Pb	Hg
M1	92,2 ± 0,5	36 ± 1	8,3 ± 0,1	160 ± 6	2,7 ± 0,3	0,151 ± 0,003
M2	90,9 ± 0,9	44 ± 2	8,8 ± 0,5	187 ± 5	3,13 ± 0,1	0,323 ± 0,009
M3	248 ± 1	93 ± 6	23 ± 1	478 ± 7	7,1 ± 0,3	1,123 ± 0,004
M7	87,9 ± 0,5	95 ± 5	36 ± 4	497 ± 12	8,5 ± 0,1	0,298 ± 0,007
M8	71,3 ± 0,3	24 ± 1	8,5 ± 0,3	146 ± 6	4,9 ± 0,3	0,045 ± 0,002
M9	44,9 ± 0,3	11 ± 1	4,1 ± 0,5	96 ± 4	2,8 ± 0,2	0,288 ± 0,008
M11	164 ± 4	27 ± 2	11 ± 1	200 ± 9	3,6 ± 0,2	0,253 ± 0,006
M12	3,0 ± 0,1	6,4 ± 0,4	2,4 ± 0,1	37,9 ± 0,4	1,1 ± 0,1	0,076 ± 0,002
M13	19,8 ± 0,1	17 ± 1	4,4 ± 0,2	76 ± 1	1,5 ± 0,1	0,064 ± 0,002
M14	363 ± 2	54 ± 2	32 ± 1	430 ± 9	13,4 ± 0,1	0,169 ± 0,006
M16	78 ± 2	99 ± 7	47 ± 2	661 ± 14	29,1 ± 0,2	0,139 ± 0,010
M24	95,2 ± 0,4	59 ± 3	15 ± 1	247 ± 5	4,1 ± 0,7	0,226 ± 0,005
M25	124 ± 1	102 ± 2	28 ± 2	513 ± 12	12 ± 1	0,291 ± 0,007
M26	44 ± 10	33 ± 1	14 ± 2	254 ± 7	9,0 ± 0,8	0,815 ± 0,021
M27	128 ± 1	33 ± 2	15 ± 1	241 ± 6	12 ± 1	0,347 ± 0,009
M32	6,2 ± 0,4	8,5 ± 0,2	1,7 ± 0,1	29 ± 1	0,2895 ± 0,0005	0,040 ± 0,001
M33	488 ± 2	96 ± 7	24 ± 1	549 ± 3	13 ± 2	0,340 ± 0,013
M34	36,1 ± 0,6	12 ± 1	4,7 ± 0,2	73 ± 1	1,5 ± 0,1	0,073 ± 0,001
M35	104 ± 2	44 ± 2	17 ± 2	287 ± 10	8,2 ± 0,4	0,354 ± 0,007
M37	145 ± 1	36 ± 3	20 ± 1	328 ± 9	11,0 ± 0,5	0,407 ± 0,015
M38	136 ± 1	87 ± 3	36 ± 3	667 ± 8	23 ± 3	0,341 ± 0,013
M39	31,5 ± 0,6	18 ± 2	7,1 ± 0,6	150 ± 2	5,1 ± 0,3	0,540 ± 0,002
M40	827 ± 6	43 ± 1	43 ± 1	21,3 ± 0,5	4,2 ± 0,1	0,334 ± 0,011
M41	983 ± 7	84 ± 2	24 ± 4	266 ± 3	9,7 ± 0,2	3,51 ± 0,13
M42	476 ± 1	29,6 ± 0,2	19 ± 1	101 ± 1	10,8 ± 0,1	2,22 ± 0,04
M43	204 ± 1	22, 2 ± 0,1	22 ± 1	71,6 ± 0,3	17 ± 1	1,41 ± 0,04
M44	412 ± 3	44,6 ± 0,3	48 ± 1	145 ± 4	4,6 ± 0,1	2,20 ± 0,07
M45	276 ± 3	15,5 ± 0,4	11 ± 1	130 ± 2	16,8 ± 0,3	1,59 ± 0,06
M46	891 ± 18	28,9 ± 0,2	23 ± 3	120 ± 1	15,7 ± 0,4	2,28 ± 0,07

Apéndice II. Concentraciones de los elementos en muestras de orina 24 horas del grupo control.

Muestras	Zn	Cu	Cr	Se	Pb	Hg
C1	129 ± 6	62 ± 7	42 ± 4	604 ± 28	16 ± 1	0,933 ± 0,024
C2	68,9 ± 1,4	22 ± 1	18 ± 2	232 ± 11	10 ± 1	0,355 ± 0,010
C3	253 ± 1	62 ± 7	64 ± 5	965 ± 26	27 ± 1	1,81 ± 0,04
C4	223 ± 1	36 ± 4	36 ± 3	223 ± 1	20 ± 2	2,16 ± 0,04
C5	362 ± 2	33 ± 5	38 ± 3	555 ± 9	17 ± 1	1,13 ± 0,03
C6	56,3 ± 0,8	4,1 ± 0,6	5,8 ± 0,5	78 ± 1	1,5 ± 0,1	0,151 ± 0,006
C7	293 ± 32	14 ± 2	54 ± 5	659 ± 76	5,9 ± 0,2	1,73 ± 0,02
C8	22,4 ± 0,4	NA	6,2 ± 0,9	101 ± 2	1,1 ± 0,1	0,610 ± 0,022
C9	268 ± 9	36 ± 5	59 ± 2	760 ± 23	23 ± 1	1,46 ± 0,02
C10	NA	NA	NA	NA	NA	1,84 ± 0,07

Apéndice III. Concentraciones de los elementos en muestras de cabello de niños con Síndrome de Espectro Autista.

Muestras	Zn	Cu	Pb	Cd	Hg
M1	259 ± 17	63 ± 2	0,94 ± 0,04	0,057 ± 0,005	0,161 ± 0,030
M2	114 ± 3	5,4 ± 0,2	1,69 ± 0,03	0,013 ± 0,001	0,086 ± 0,001
M3	78 ± 8	28 ± 1	3,7 ± 0,1	0,053 ± 0,002	0,946 ± 0,027
M4	134 ± 1	3,5 ± 0,2	< ld	< ld	0,037 ± 0,007
M5	210 ± 15	6,1 ± 0,4	0,83 ± 0,02	< ld	0,265 ± 0,027
M6	144 ± 2	4,5 ± 0,1	0,344 ± 0,001	< ld	0,383 ± 0,035
M7	116 ± 5	61 ± 5	1,5 ± 0,1	< ld	0,030 ± 0,009
M8	172 ± 2	6,8 ± 0,1	0,57 ± 0,01	< ld	0,127 ± 0,046
M9	110 ± 4	4,6 ± 0,2	0,67 ± 0,05	< ld	0,521 ± 0,008
M10	163 ± 1	7,9 ± 0,6	0,95 ± 0,02	< ld	0,059 ± 0,003
M11	211 ± 2	54 ± 1	0,82 ± 0,03	< ld	0,250 ± 0,003
M12	126 ± 1	4,4 ± 0,2	< ld	< ld	0,063 ± 0,002
M13	121 ± 5	3,7 ± 0,2	0,32 ± 0,01	< ld	0,059 ± 0,007
M14	144 ± 4	3,9 ± 0,3	1,1 ± 0,1	< ld	0,072 ± 0,001
M15	115 ± 4	4,2 ± 0,1	0,08 ± 0,01	< ld	2,97 ± 0,03
M16	80 ± 12	18,7 ± 0,4	1,79 ± 0,03	< ld	0,104 ± 0,006
M17	177 ± 5	8,9 ± 0,4	0,20 ± 0,01	< ld	0,711 ± 0,023
M18	120 ± 4	4,6 ± 0,1	0,72 ± 0,04	< ld	0,225, ± 0,007
M19	132 ± 2	5,5 ± 0,1	0,32 ± 0,03	< ld	0,696 ± 0,022
M20	56 ± 1	5,6 ± 0,2	6,5 ± 0,9	0,39 ± 0,02	0,422 ± 0,022
M21	163 ± 2	8,7 ± 0,5	3,5 ± 0,3	0,42 ± 0,01	0,177 ± 0,006
M22	69 ± 5	5,6 ± 0,2	5,48 ± 0,03	< ld	0,032 ± 0,002
M23	88 ± 4	52 ± 3	0,74 ± 0,02	< ld	0,058 ± 0,005
M24	97 ± 1	22 ± 1	< ld	< ld	0,152 ± 0,060
M25	93 ± 8	5,2 ± 0,2	0,75 ± 0,01	< ld	0,0008 ± 0,0002
M26	134 ± 9	5,8 ± 0,4	0,41 ± 0,03	< ld	0,825 ± 0,049
M27	216 ± 3	6,6 ± 0,2	4,1 ± 0,4	0,057 ± 0,002	0,213 ± 0,002
M28	37 ± 1	5,1 ± 0,1	2,7 ± 0,2	< ld	0,587 ± 0,018
M29	58 ± 8	4,8 ± 0,3	4,5 ± 0,2	< ld	0,343 ± 0,035
M31	115 ± 4	10 ± 1	< ld	< ld	0,304 ± 0,007

Apéndice IV. Concentraciones de los elementos en muestras de cabello del grupo control.

Muestras	Zn	Cu	Pb	Cd	Hg
C1	119 ± 1	5,1 ± 0,2	1,6 ± 0,1	< ld	0,841 ± 0,020
C2	110 ± 5	5,4 ± 0,2	3,3 ± 0,3	< ld	0,595 ± 0,006
C3	110 ± 2	3,3 ± 0,2	0,26 ± 0,02	< ld	0,411 ± 0,070
C4	90 ± 4	3,4 ± 0,1	1,5 ± 0,1	< ld	0,436 ± 0,020
C5	125 ± 5	4,6 ± 0,2	< ld	< ld	0,368 ± 0,008
C6	76 ± 5	4,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	< ld	0,807 ± 0,001
C7	145 ± 3	6,9 ± 0,2	4,3 ± 0,4	< ld	0,565 ± 0,086
C8	79 ± 1	5,5 ± 0,1	0,38 ± 0,02	< ld	0,128 ± 0,011

Apéndice V. Resultado del estudio de correlaciones entre elementos, aplicado a los datos obtenidos a partir del análisis de las muestras de orina 24 horas de niños con Síndrome de Espectro Autista.

	Cr	Cu	Hg	Pb	Se	Zn

Cr		0,8010 (29) 0,0000	0,4379 (29) 0,0205	0,6788 (29) 0,0003	0,5527 (29) 0,0034	0,6833 (29) 0,0003
Cu	0,8010 (29) 0,0000		0,1980 (29) 0,2947	0,4783 (29) 0,0114	0,8315 (29) 0,0000	0,4330 (29) 0,0219
Hg	0,4379 (29) 0,0205	0,1980 (29) 0,2947		0,5384 (29) 0,0044	0,1271 (29) 0,5013	0,6768 (29) 0,0003
Pb	0,6788 (29) 0,0003	0,4783 (29) 0,0114	0,5384 (29) 0,0044		0,5453 (29) 0,0039	0,5596 (29) 0,0031

Apéndice V. Resultado del estudio de correlaciones entre elementos, aplicado a los datos obtenidos a partir del análisis de las muestras de orina 24 horas de niños con Síndrome de Espectro Autista.

	Cr	Cu	Hg	Pb	Se	Zn
Se	0,5527 (29) 0,0034	0,8315 (29) 0,0000	0,1271 (29) 0,5013	0,5453 (29) 0,0039		0,2030 (29) 0,2828
Zn	0,6833 (29) 0,0003	0,4330 (29) 0,0219	0,6768 (29) 0,0003	0,5596 (29) 0,0031	0,2030 (29) 0,2828	

Esta tabla muestra el intervalo de correlaciones de Spearman entre cada par de variables. Estos coeficientes de correlación oscilan entre -1 y +1 y miden la fuerza de la asociación entre las variables. En contraste con las correlaciones de Pearson, los coeficientes de Spearman se calculan a partir de las filas de los valores de los datos y no a partir de los valores propios. En consecuencia, son menos sensibles a los valores anómalos. También se indica entre paréntesis el número de pares de valores de datos utilizados para calcular cada coeficiente. El tercer número en cada lugar de la tabla es un valor-P que dan las pruebas de significación estadística de la estimación de correlaciones. Valores-P por debajo de 0,05 indican una correlación estadísticamente significativa diferente de cero, a un 95% de confianza.

Apéndice VI. Formato de encuesta aplicada a padres y representantes de niños de Espectro Autista.



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			
2. ANTECEDENTES			
Patología que presenta			
Medicamentos administrados en los últimos 6 meses			
3. HÁBITOS NUTRICIONALES DEL MENOR			
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			

3. INFORMACIÓN SOBRE LA MADRE DEL INFANTE											
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						
4. INFORMACIÓN SOBRE EL PADRE DEL INFANTE											
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						

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. Mercedes V. Rosales M.

Apéndice VII. Formato de folletos entregados a padres y representantes de niños de Espectro Autista.

Recolección de muestras

A. Muestras de orina.

- Se le suministrará a los representantes una botella de vidrio color ámbar, de un volumen de 1L para la recolección de la muestra.
- La toma de la muestra debe tener una duración de 24 horas (ej: 8 de la mañana de un día hasta las 8 del día siguiente, si a esa hora el infante orina por primera vez), recolectándose en el recipiente previamente mencionado todas las micciones que efectúe el niño durante ese tiempo, excepto la primera micción del día (se desecha).
- La botella debe mantenerse refrigerada, es decir, tras cada micción del infante, debe introducirse a 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 los datos del infante.



**Centro de Química
Analítica**

Contacto:
Mercedes Rosales

Asentado de correos 47102-Caracas
104-A
Tel: 0212- 251.08.54 / Cel: 0414- 087.71.80
Correo: mercedesvarela@hotmail.com

Universidad Central de Venezuela
Facultad de Ciencias
Escuela de Química



Imagen

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

Realizado por:
Mercedes Rosales

Apéndice VII. Formato de folletos entregados a padres y representantes de niños de Espectro Autista.

 Justificación 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. 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. Actualmente, la mayoría de los estudios en muestras biológicas (cabello, sangre, orina), que requieran 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 reciprocidad metal-autismo. Por tal motivo, surge la necesidad de realizar investigaciones más amplias que contribuyan al encuentro de datos confiables, útiles para la creación de bases de datos que favorezcan la dilucidación del origen del espectro autista y, de ser posible, la disminución y/o cura del mismo. 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. Objetivo General Determinar elementos traza en muestras biológicas de niños venezolanos con Síndrome de Espectro Autista empleando técnicas de espectroscopia atómica. Objetivos Específicos - Optimizar las metodologías de análisis para la determinación de elementos traza en muestras de cabello y orina, a través de técnicas espectroscópicas y determinar las figuras de mérito correspondientes. - Determinar las concentraciones de metales esenciales como: Zn, Cu, Cr, Se y no esenciales como: Hg, Pb, Cd, en cabello y orina de niños de espectro autista, a través de técnicas de espectroscopia atómica.	- Comparar el contenido de los elementos traza de niños autistas con la de un grupo control (niños sanos). - Estudiar la existencia de posibles correlaciones entre la concentración de los elementos traza en niños autistas, con factores como la dieta y la severidad del trastorno. Recolección de Muestras A. Muestras de cabello - 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 tomará 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 éstos. Utilizar tijeras de acero inoxidable o de plástico. - Recortar aproximadamente 100g de cabello de la región occipital de la cabeza del infante. El corte debe realizarse lo más cercano posible al cuero cabelludo. (Ver figura 1)  Figura 1. Región del cuero cabelludo recomendada para los cortes de muestra.
--	---	---

Apéndice IX. Glosario de términos.

- **Anemia macrocítica:** es un término generalizado que incluye a un grupo de anemias caracterizadas por eritrocitos con un volumen corpuscular medio (VCM) mayor de 100 micras cúbicas. Generalmente son megaloblásticas (tamaño grande de sus precursores en la médula ósea).
- **Apoenzimas:** es la parte proteica de una enzima, desprovista de los cofactores o coenzimas que puedan ser necesarios para que la enzima sea funcionalmente activa. La apoenzima es catalíticamente inactiva.
- **Cirrosis hepática:** Es la cicatrización y funcionamiento deficiente del hígado como resultado de una enfermedad hepática crónica.
- **Cisteína:** es uno de los veinte aminoácidos que utilizan las células para sintetizar proteínas. Está codificada en el ARN mensajero como UGU o UGC. La cisteína es un aminoácido no esencial, sulfurado, que puede oxidarse dando el dímero cistina. Se sintetiza a partir de la metionina, que es un aminoácido esencial, por medio de dos reacciones: transmetilación, en la que la metionina se transforma en homocisteína y transulfuración, en la que la homocisteína pasa a ser cisteína.
- **Citocromos:** son proteínas de color oscuro que desempeñan una función vital en el transporte de energía química en todas las células vivas. Las células animales obtienen la energía de los alimentos mediante un proceso llamado respiración aerobia; las plantas capturan la energía de la luz solar por medio de la fotosíntesis. Los citocromos intervienen en los dos procesos.
- **Dismutasa de superóxido:** La enzima superóxido dismutasa (SOD) cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno. Debido a esto es una importante defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno.
- **Encefalopatías:** son afecciones del cerebro.

Apéndice IX. Glosario de términos.

- **Eritrocitos** (glóbulos rojos o hematíes): son los elementos formes cuantitativamente más numerosos de la sangre. La hemoglobina es uno de sus principales componentes y su objetivo es transportar el oxígeno hacia los diferentes tejidos del cuerpo.
- **Fenilcetonuria**: es un tipo de hiperfenilalaninemia, también conocida como PKU, es una alteración del metabolismo en el que el organismo no puede metabolizar el aminoácido fenilalanina en el hígado. Esta enfermedad es genética y es provocada por la carencia de enzima fenilalanina hidroxilasa .
- **Hemoglobina**: es una heteroproteína de la sangre, de peso molecular 64.000 (64 kD), de color rojo característico, que transporta el oxígeno desde los órganos respiratorios hasta los tejidos, en mamíferos, ovíparos y otros animales.
- **Metaloenzimas**: una enzima que contiene como parte esencial de su estructura un átomo de metal (cobalto, cobre, hierro, molibdeno o zinc).
- **Metalotioneinas**: familia de proteínas no enzimáticas de bajo peso molecular con alto contenido en azufre y en metales. Juegan un papel fundamental en la fijación de algunos oligoelementos como el cobre o zinc por algunas células. Se cree que algunas mutaciones de la metalotioneina son responsables del autismo
- **Mioglobina**: es una hemoproteína muscular, estructuralmente y funcionalmente muy parecida a la hemoglobina, es una proteína relativamente pequeña constituida por una cadena polipeptídica de 153 residuos aminoacídicos que contiene un grupo hemo con un átomo de hierro, y cuya función es la de almacenar y transportar oxígeno. También se denomina miohemoglobina o hemoglobina muscular.
- **Neurofibromatosis**: son trastornos genéticos del sistema nervioso que afectan principalmente al desarrollo y crecimiento de los tejidos de las células neurales (nerviosas). Estos trastornos ocasionan tumores que crecen en los nervios y

producen otras anormalidades tales como cambios en la piel y deformidades en los huesos.

- **Pica:** es, según el Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales (DSM), un trastorno de la ingestión y de la conducta alimentaria. Conocido como una variante de un tipo de trastorno alimentario en el que existe un deseo irresistible de comer o lamer sustancias no nutritivas y poco usuales como tierra, tiza, yeso, virutas de la pintura, bicarbonato de sosa, almidón, pegamento, moho, cenizas de cigarrillo, insectos, papel o cualquier otra cosa que no tiene, en apariencia, ningún valor alimenticio.
- **Reticulocitos:** son glóbulos rojos que no han alcanzado su madurez. Los mismos se producen por causa de algunas anemias, el organismo incrementa la producción de glóbulos rojos y los envía al torrente sanguíneo antes de que sean maduros. Los mismos se caracterizan por presentar una red de filamentos y gránulos.
- **Reticulocitosis:** Un aumento en la circulación de Reticulocitos, el cual está entre los Signos mas simples y mas relevantes de la producción acelerada de Eritrocitos. La Reticulocitosis ocurre durante la Regeneración activa de la Sangre (estimulación de la Médula Ósea roja) y en ciertos tipos de Anemia, particularmente en la Anemia Hemolítica Congénita