

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA



**DETERMINACION DE ELEMENTOS ESENCIALES EN CABELLO Y SUERO
SANGUINEO DE NIÑOS CON TRASTORNO DEL ESPECTRO AUTISTA (TEA)
MEDIANTE ESPECTROMETRIA DE EMISION OPTICA CON PLASMA
INDUCTIVAMENTE ACOPLADO (ICP-OES)**

Trabajo Especial de Grado presentado ante
la Ilustre Universidad Central de Venezuela,
por la Br. Ely A. Charris H. para optar al
título de Licenciada en Química.

Tutor: Dr. José Chirinos.

Caracas, Mayo del 2015.

Yo, profesor José Chirinos, investigador del Centro de Química Analítica de la Universidad Central de Venezuela.

Certifico que el presente Trabajo Especial de Grado, titulado:

Determinación de elementos esenciales en cabello y suero sanguíneo de niños con trastorno del espectro autista (TEA) mediante espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES)

Que presenta la Br. Ely Adriana Charris Hernández, para aspirar al título de Licenciada en Química, ha sido realizado en el Centro de Química Analítica, de la Escuela de Química de la Universidad Central de Venezuela, bajo mi dirección, durante los años 2014 - 2015, y con esta fecha autorizo su presentación.

Caracas, Mayo del 2015.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'José Chirinos', is positioned above a horizontal line.

Dr. José Chirinos
(Tutor)

Los abajo firmantes asignados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del trabajo Especial de Grado titulado: “Determinación de elementos esenciales en cabello y suero sanguíneo de niños con trastorno del espectro autista (TEA) mediante espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES)”. Presentado por la Br. Ely Adriana Charris Hernández, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar por el título de Licenciada en Química.



Prof.: José Chirinos
(Tutor)



Prof.: Gustavo Pérez
(Jurado)



Prof.: Rosa Amaro
(Jurado)

AGRADECIMIENTOS

- Primeramente a Dios por bendecirme para llegar hasta donde he llegado, por ser mi guía, por protegerme y darme fuerzas para superar cualquier obstáculo.
- A mi madre, por ser ejemplo de vida, por enseñarme a no desfallecer, por brindarme su confianza y apoyo incondicional en cada meta que me propongo.
- A mis hermanos, por tener siempre tiempo disponible para escucharme y aconsejarme, a ti Karina, porque a pesar de la distancia siempre estas cerca, para corregir mis faltas y para aplaudir mis triunfos.
- A mis tíos, José y Pilar, por abrirme las puertas de su casa y brindarme su apoyo a lo largo de mi carrera.
- A la familia Delgado-Hurtado, por considerarme como un miembro más de la familia, por brindarme un hogar y no hacerme sentir sola, por su enorme apoyo durante mi carrera y por sus sabias palabras en mis momentos de tristezas.
- A mis amigos y compañeros por todos los momentos vividos, alegrías y tristezas compartidas, estudios hasta la madrugada, partidas de pin-pon, celebraciones de finales de laboratorios, ferias de ciencias, amigos secretos, celebraciones de cumpleaños, días de playa y todo lo que falta.
- A mi tutor, Dr. José Chirinos, por depositar su confianza en mí para la realización de este proyecto, por su paciencia y asesoramiento profesional de primera calidad.
- A todas las personas que hicieron posible la ejecución de este proyecto, a la directiva de SOVENIA por su colaboración, a mi prima Vanessa Hudson y su compañero Andy Sánchez por su apoyo profesional, a mi amigo Elvis Ramos por su enorme apoyo logístico y a los padres y/o representantes de los niños por el interés y la colaboración.
- A la Ilustre Universidad Central de Venezuela y en particular a la Facultad de Ciencias por mi excelente formación profesional.

RESUMEN

Los niveles excesivos de elementos potencialmente tóxicos y deficiencia de elementos esenciales en el organismo se han asociado en los últimos años como una de las posibles causas de los trastornos del espectro autista (TEA). En esta investigación se determinó la concentración de los elementos traza Ca, Fe, Zn, Cu, y Mg en muestras de suero sanguíneo y cabello de un grupo de niños con TEA pertenecientes a la Sociedad Venezolana del Niño y Adulto Autista (SOVENIA), con edades comprendidas entre 2 y 14 años y de un grupo de niños control, con edades similares, todos habitantes de la Gran Caracas.

Se analizaron en total 42 muestras de suero sanguíneo y 29 muestras de cabello. La determinación de los elementos se realizó mediante espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES) y el análisis estadístico de los datos se ejecutó empleando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.15.

Los resultados obtenidos fueron comparados con intervalos de referencia nacionales para el caso del suero sanguíneo e internacionales para el caso del cabello. En las muestras de suero sanguíneo se observó niveles bajos de Ca para los niños control y el grupo de niños autistas presentó niveles bajos de Ca y Zn, y niveles elevados de Fe. Por su parte, en las muestras de cabello, se observaron niveles bajos de Fe y Zn para ambos grupos, y además el grupo de niños autistas también presentó niveles bajos de Cu. La relación Zn/Cu en cabello no proporcionó información útil, sin embargo esta relación en las muestras de suero sanguíneo concuerda con investigaciones internacionales.

La cantidad de elementos esenciales en el organismo de niños autistas proveniente tanto de una exposición reciente como de una acumulación es similar a la encontrada en los niños control, y está influenciada en los niños autistas por el consumo de suplementos vitamínicos, los cuales no se considera que sean ingeridos en sobredosis.

INDICE DE CONTENIDO

1. INTRODUCCION.....	10
2. MARCO TEORICO	12
2.1 Autismo.....	12
2.2 Historia: Autismo como Síntoma	12
2.3 Historia: Autismo como Síndrome.....	13
2.4 Clasificación de los Trastornos del Espectro Autista	14
2.5 Síntomas	16
2.6 Etiología o causas del trastorno del espectro autista	19
2.7 Importancia de los elementos traza en el organismo	21
2.8 Estrés Oxidativo.....	26
2.9 Muestras biológicas empleadas en el análisis de elementos traza en niños con TEA.....	27
2.9.1 Sangre	27
2.9.2 Suero Sanguíneo	29
2.9.3 Cabello	29
2.9.4 Orina	31
2.10 Intervalos de referencia de los elementos Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Al, Cr y Pb en suero sanguíneo y cabello.....	32
2.11 Limitaciones presentes al trabajar con muestras biológicas.....	33
2.12 Técnicas analíticas empleadas para la determinación de elementos traza en cabello y suero sanguíneo de niños con TEA	33
2.12.1 Espectrometría de Masas con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-MS).....	36
2.12.2 Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES) ...	36
3. ANTECEDENTES.....	39
4. JUSTIFICACION.....	49
5. OBJETIVOS.....	50
5.1 Objetivo General	50
5.2 Objetivos Específicos.....	50

6. DESCRIPCION DE LA POBLACION.....	51
7. METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	52
7.1 Obtención y almacenamiento de las muestras de cabello y suero sanguíneo.....	52
7.2 Soluciones y reactivos utilizados.....	52
7.3 Tratamiento de muestras	53
7.3.1 Tratamiento de las muestras de suero sanguíneo.....	54
7.3.2 Tratamiento de las muestras de cabello.....	54
7.4 Instrumentación	55
7.4.1 Espectrómetro de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado	55
7.4.2 Extracción asistida por energía de ultrasonido	57
7.5 Análisis estadísticos de datos	58
8. RESULTADOS Y DISCUSIONES	60
8.1 Distribución de la concentración de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de suero sanguíneo	60
8.2 Distribución de la concentración de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de cabello	66
8.3 Estudio comparativo de la relación Zn/Cu en suero sanguíneo y cabello de niños autistas y niños control	74
9. CONCLUSIONES	79
10. RECOMENDACIONES.....	80
11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	81
12. APENDICES	88

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Intervalos de referencia de Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Al, Cr y Pb en suero sanguíneo y cabello.	32
Tabla 2. Mediana de los niveles de elementos potencialmente tóxicos y elementos esenciales en muestras de cabello. Investigación de Al-Farsi, Y.	43
Tabla 3. Concentraciones de Zn y Cu en suero sanguíneo de niños autistas y niños control. Investigación de Li, S.	45
Tabla 4. Concentraciones en muestras de cabello y orina. Rosales, M.	46
Tabla 5. Concentraciones en muestras de cabello y orina. Castillo, E.	47
Tabla 6. Concentraciones en muestras de cabello y orina. Castillo, E.	48
Tabla 7. Concentración de los patrones empleados en la curva de calibración.	53
Tabla 8. Condiciones de operación del equipo ICP-OES y longitudes de onda de trabajo.	56
Tabla 9. Estadística descriptiva de las muestras de suero sanguíneo.	60
Tabla 10. Estadística descriptiva de las muestras de cabello.	67
Tabla 11. Relación Zn/Cu provenientes de distintos estudios en muestras de cabello y suero sanguíneo.	76

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comportamientos asociados a los TEA.	17
Figura 2. Representación cualitativa de la respuesta de un organismo frente a la dosis de un elemento químico.	24
Figura 3. Componentes de la Sangre.....	28
Figura 4. Fases del Cabello.....	30
Figura 5. Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo.	35
Figura 6. Componentes de un ICP-OES.	38
Figura 7. Niveles de Zn y Cu antes y después del tratamiento con antioxidantes. Russo A. y DeVito R.....	40
Figura 8. Espectrómetro de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado.	55
Figura 9. Baño de Ultrasonido.....	57
Figura 10. Distribución de las concentraciones de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de suero sanguíneo.....	62
Figura 11. Diagrama de caja y bigote de las concentraciones de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de suero sanguíneo.	64
Figura 12. Distribución de las concentraciones de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de cabello.....	69
Figura 13. Diagrama de caja y bigote para las concentraciones de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de cabello.	71
Figura 14. Relación Zn/Cu para muestras de cabello y suero sanguíneo en niños con autismo y niños control.....	75
Figura 15. Diagrama de caja y bigote de la relación Zn/Fe en suero sanguíneo.....	77

1. INTRODUCCION

Los Trastornos del Espectro Autista (TEA) son un grupo de alteraciones en el neurodesarrollo caracterizadas por dificultades en la interacción social, la comunicación y la presencia de conductas restringidas y repetitivas. ^[1,2]

La incidencia del autismo en los Estados Unidos estimada por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, por sus siglas en inglés) para los años 90 fue de 1 por cada 110 niños, pero estudios recientes han demostrado que esta incidencia ha ido aumentando a 1 por cada 88 niños, haciendo importante la realización o desarrollo de estudios que den algunas ideas de las posibles causas de dicho incremento y de esta manera contribuir al diagnóstico temprano del síndrome. ^[2,3]

Las causas de los TEA no están totalmente esclarecidas, en parte debido a los complejos fenotipos de comportamientos y a la probabilidad de que múltiples factores genéticos y ambientales o la combinación de ambos contribuyan a su etiología. ^[4] Estudios en gemelos y hermanos demostraron que las interacciones de múltiples genes están involucradas en la herencia del autismo, comprobando así la participación de factores genéticos. Sin embargo, el aumento en la incidencia del autismo no puede explicarse completamente por causas genéticas y se piensa que eventos ambientales podrían contribuir, ya sea a través de la interacción con algunos genes o directamente. ^[5]

La presencia de niveles excesivos de elementos potencialmente tóxicos y deficiencia de elementos esenciales en el cuerpo humano ha sido asociada no solo con alteraciones cognitivas, sino también con trastornos psiquiátricos en niños. Para explicar parte de estos trastornos, algunos autores han sugerido la necesidad de determinar la carga corporal de sustancias tóxicas ambientales, así como su consumo en la dieta diaria. ^[6]

Hoy en día se conoce mucho sobre los efectos que pueden ocasionar la exposición a ciertos elementos sobre la salud, es por ello que numerosos estudios han vinculado el exceso de metales potencialmente tóxicos así como también la deficiencia o exceso de elementos esenciales con la patogénesis del autismo, siendo esta una de las posibles causas más estudiada en los últimos años.

La determinación del contenido de elementos en muestras biológicas como: orina, sangre y cabello, puede realizarse mediante la aplicación de métodos instrumentales de alta sensibilidad; proporcionando información útil acerca del estado del organismo para los médicos a nivel mundial. Los desniveles en la cantidad de metales son tratados mediante el consumo de vitaminas y/o suplementos minerales, ya que estos ayudan a disminuir la severidad de algunos síntomas del TEA y estudios recientes así lo demuestran. ^[16, 20]

Debido a todo lo que se ha mencionado anteriormente, surge la necesidad de evaluar los niveles de elementos esenciales en cabello y suero sanguíneo de niños con TEA y de esta manera determinar si la dosis medicada de suplementos vitamínicos es la indicada, además este tipo de estudio podría llegar a formar parte de los exámenes rutinarios recomendados por los médicos venezolanos, ya que actualmente los padres de muchos niños acuden a laboratorios en el extranjero como Doctor's Data Inc. (St. Charles, Illinois, USA) para solicitar el análisis, el cual resulta bastante costoso y/o de difícil acceso para gran parte de la población. De esta manera se busca contribuir a que pueda establecerse correlaciones entre la carga metálica presente en el organismo del niño y la etiología del síndrome, además de determinar parámetros de referencia nacional que podrían ser útiles para el diagnóstico temprano del síndrome y su posterior tratamiento.

2. MARCO TEORICO

2.1 Autismo

Es un grupo de trastornos del desarrollo cerebral, a los que se llama colectivamente trastornos del espectro autista (TEA). El término “espectro” se refiere a la amplia gama de síntomas, habilidades y niveles de deterioro o discapacidad que pueden tener los niños con TEA, entre ellos, el comportamiento estereotipado / repetitivo, déficit en la comunicación y la reciprocidad social, así como patrones de movimiento anormales, y disfunción sensorial. Algunos niños padecen un deterioro leve causado por sus síntomas, mientras que otros están gravemente discapacitados. ^[5,10]

2.2 Historia: Autismo como Síntoma

Etimológicamente, el término autismo proviene de la palabra griega “eafismo”, cuyo significado es “encerrado en uno mismo”, y su introducción en el campo de la psicopatología fue obra del psiquiatra suizo Eugen Bleuler que en su obra *Dementia Praecox or the Group of Schizophrenias* (traducido al Inglés en 1950, original en alemán en 1913) utiliza el vocablo autista para definir unos de los síntomas patognomónicos de la esquizofrenia. Para Bleuler, el síntoma autista consiste en una separación de la realidad externa, es decir la retirada activa con que algunos pacientes se repliegan al terreno de la fantasía. En la mayoría de los casos, el objetivo de esta conducta es no perder la concentración en las fantasías internas, pero en algunos enfermos este aislamiento sirve para frenar un aumento de las emociones. Según el psiquiatra suizo, esa ruptura con el exterior no es absoluta, de manera que la conciencia en relación con los hechos cotidianos puede estar bien conservada y solo en los casos más severos puede observarse un aislamiento absoluto. ^[7, 8]

En la misma obra, Bleuler desarrolla el concepto de “pensamiento autista” que según él, tiene su origen en la fragmentación esquizofrénica de la mente, este tipo de pensamiento puede estar dirigido por las necesidades afectivas del sujeto. La realidad objetiva es sustituida normalmente por alucinaciones y el paciente percibe su mundo “fantasioso” como real y la realidad como una ilusión.^[8]

2.3 Historia: Autismo como Síndrome

En 1943, El Dr. Leo Kanner, psiquiatra austríaco, en su publicación “Autistic disturbances of affective contact” expone la descripción inicial del síndrome autista. En su investigación observó 11 niños que, con independencia de sus diferencias interindividuales, presentaban una “serie de características esenciales comunes” como: la preferencia por la soledad, la insistencia de la igualdad, el gusto por rutinas elaboradas, entre otras. A parte de la dificultad para establecer relaciones interpersonales y con el mundo externo en general, Kanner dio una relevancia especial a las alteraciones del lenguaje; de los 11 niños, solo 8 presentaban lenguaje hablado, pero sin carácter comunicativo en ningún caso y caracterizado por ser memorístico y repetitivo; también observó una gran tendencia a la literalidad, además que la articulación y fonética parecían muy conservadas, deseo ansioso y obsesivo de mantener la invariabilidad, y manifestaban ciertos rasgos de inteligencia como su excelente memoria mecánica. Por último Kanner afirma que varios niños son un poco topes en marcha y en la motricidad gruesa, pero que todos ellos poseen una excelente motricidad fina, se les describe globalmente como físicamente normales aunque añade que 5 cinco de ellos tienen un cráneo relativamente aumentado. Todas estas observaciones se convirtieron en la base para la detección del autismo precoz.

Por otro lado, y a solo un año después de la publicación de Kanner, el Dr. Hans Asperger publica su tesis doctoral “Die Autistischen Psychopathen im Kindesalter” en la que mostraba una serie de casos que compartían los rasgos patognomónicos del

síndrome de Kanner, aunque los niveles cognitivos globales eran significativamente superiores. El artículo se difundió poco, quizás porque estaba escrito en alemán y fue publicado en Europa durante la Segunda Guerra Mundial. Asperger afirma que el trastorno fundamental del síndrome lo constituyen las limitaciones de sus relaciones sociales, el autor da mucha relevancia a la dificultad de estos niños para expresar y comprender sentimientos. En el estudio de Asperger todos los niños hablaban y presentaban intereses intensos o inusuales, expresándose en algunos casos como “pequeños profesores” acerca de su área de interés. Todo esto que Asperger denominó como “psicopatía autística” paso a conocerse como síndrome de Asperger en su honor, sirviendo para denominar autismos de “alto rendimiento”. Con lo que aún no hay acuerdo si el síndrome de Asperger es un síndrome independiente o simplemente un subgrupo del autismo. [8,9]

2.4 Clasificación de los Trastornos del Espectro Autista

El Manual Diagnóstico y Estadístico de Trastornos Mentales define a los TEA como cinco trastornos, llamados algunas veces como: trastornos generalizados de desarrollo (TGD). [10]

➤ **Trastorno Autista (Autismo Clásico):** Es el trastorno en el que la gente piensa más frecuentemente al escuchar la palabra “autismo”. Las personas con trastorno autista por lo general tienen retrasos significativos en el desarrollo del lenguaje, problemas de socialización y comunicación, así como también conductas e intereses inusuales. Algunas personas con autismo funcionan a un nivel elevado de rendimiento, con inteligencia y lenguaje intacto mientras que otros pueden carecer de lenguaje verbal y/o sufrir de retraso mental. [11,17]

➤ **Trastorno de Asperger (Síndrome de Asperger):** Las personas con síndrome de Asperger suelen presentar algunos síntomas más leves que el trastorno autista. Pueden tener dificultad para socializar así como intereses y conductas inusuales. Sin embargo, no presentan un retraso clínicamente significativo en el desarrollo del lenguaje ni tampoco en su discapacidad intelectual. ^[8, 11]

➤ **Trastorno Generalizado de Desarrollo No Especificado (TGD-NE):** Diagnosticado a personas cuya presentación clínica es demasiado heterogénea como para cumplir los criterios exigidos para las patologías más específicas de este grupo, por ejemplo, síndrome de Asperger o autismo clásico. Es decir, reúnen algunos síntomas pero no todos, los cuales pueden ser únicamente problemas para la socialización y comunicación. ^[11, 12]

➤ **Trastorno de Rett (Síndrome de Rett):** Es un trastorno neurodegenerativo infantil caracterizado por una evolución inicial normal seguido de una regresión en el desarrollo sobretodo en el lenguaje expresivo y el uso de las manos. Se presenta casi exclusivamente en niñas, la mayoría de los casos son esporádicos y es genéticamente determinado. Antes de que los síntomas comiencen, la niña parece estar creciendo y desarrollándose normalmente. Luego, aparecen gradualmente síntomas mentales y físicos; muchas de estas niñas no pueden caminar o hablar y tienden a comunicarse con sus ojos. Necesitan educación, dietas, y tratamientos especiales para sus varios problemas. ^[13,17]

➤ **Trastorno Desintegrativo Infantil (CDD, por sus siglas en inglés):** Es una enfermedad psicológica poco conocida, sufrida por niños que tienen un aparente desarrollo normal durante los primeros años de su vida, pero llega un momento en el que empiezan a perder capacidades adquiridas relacionadas con el lenguaje expresivo o receptivo, habilidades sociales o comportamiento adaptivo, así como también habilidades motoras. Los especialistas no coinciden todavía en cuales pueden ser las

causas de su desarrollo, se ha observado que en las fases de inicio coincide, a menudo, con factores estresantes en la vida del niño, como el nacimiento de un hermano, una mudanza o problemas de salud de la madre que haya requerido hospitalización. ^[14]

2.5 Síntomas

Los síntomas de los TEA varían de un niño a otro, pero en general se encuentran dentro de 3 áreas:

- Deterioro de la actividad social
- Dificultades en la comunicación
- Conductas repetitivas y estereotipadas ^[10]

Según la Sociedad para la Ayuda del Autismo Ahora, HANS por sus siglas en inglés, el autismo se puede diagnosticar desde casa solamente por la observación del comportamiento del niño. En la figura 1 se resumen algunos comportamientos asociados al TEA. ^[15]

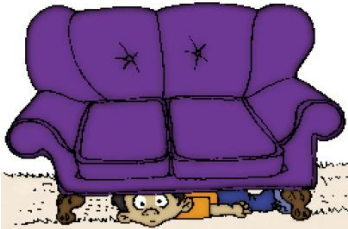
Comportamientos Sociales		
 No muestran interés en los juegos de otros niños.	 Pueden rechazar fuertemente ser cargado, abrazado o besado por sus padres.	 No muestran interés en juegos interactivos.
Comportamientos en la Comunicación		
 Desconocen el ambiente de los demás.	 Evitan el contacto visual.	 Expresan lo que quieren dirigiendo a los demás por su mano.
Comportamientos Extraños/Repetitivos		
 Aletean las manos.	 Prenden y apagan la luz obsesivamente.	 Juegan inapropiadamente con los juguetes.
 Sacuden los dedos frente a sus ojos.	 Encuentran la manera de aplicar presión profunda a su cuerpo.	 Encuentran la manera de provocar impactos pesados a su cuerpo.

Figura 1. Comportamientos asociados a los TEA.

Problemas de Motricidad		
 Tosco o torpe al caminar.	 Deficiencias motoras sutiles.	 Incapaces de montar triciclos o bicicletas.
Problemas Sensoriales		
 Dificultad extrema para cortarles el cabello.	 Actúan como sordos ante fuertes ruidos.	 Pueden quitarse o rasgar su ropa si les incomoda.
Comportamientos de Injuriarse a sí mismo.		
 Rasgarse y rasguñarse la piel.	 Morderse a sí mismo sin expresar dolor.	 Golpearse la cabeza.
Problemas de seguridad		
 No tiene sentido del peligro.	 No reconoce las situaciones donde se encuentra en peligro.	 No le temen a las alturas.

Figura 1. Comportamientos asociados a los TEA. (Continuación)

2.6 Etiología o causas del trastorno del espectro autista

Los científicos aún desconocen las causas exactas de los TEA, pero las investigaciones sugieren que tanto los genes como el entorno desempeñan un papel importante.

➤ Factores Genéticos

En casi 9 de cada 10 casos, si un gemelo que comparte exactamente el código genético con el otro que tiene TEA, el otro gemelo también lo padece. Si un hermano tiene TEA, el riesgo de los otros hermanos de desarrollar el trastorno es 35 veces mayor que el riesgo normal. Los investigadores están comenzando a identificar genes particulares que pueden aumentar el riesgo de TEA.

Sin embargo, estos científicos han tenido poco éxito en hallar exactamente cuáles son los genes involucrados. Las afecciones que presentan algunos niños con TEA y que están asociadas a los factores genéticos son:

Esclerosis tuberosa: Es un trastorno genético que produce el crecimiento de tumores no cancerosos en el cerebro y otros órganos vitales, se presenta entre el 1 – 4 % de las personas con TEA. Este trastorno es causado por una mutación genética a la que también se ha vinculado con retraso mental, epilepsia y muchos otros problemas de salud física y mental.

Síndrome X frágil: Es un trastorno genético y es la forma más común de discapacidad intelectual hereditaria, que causa síntomas similares a los del TEA. El nombre se refiere a una parte del cromosoma X que tiene una porción defectuosa que, al observarse a través del microscopio parece comprimida y frágil. El síndrome de X frágil resulta de un cambio, llamado mutación, de un gen único, en efecto esta mutación apaga el gen. Algunas personas pueden tener solo una pequeña mutación y no muestran síntoma alguno, mientras que otras tienen una mutación mayor y síntomas más graves. Aproximadamente 1 de cada 3 niños que presentan el síndrome X frágil también

cumplen con los criterios para el diagnóstico del TEA y cerca de 1 por cada 25 niños diagnosticados con TEA presentan la mutación que causa el síndrome del X frágil. Debido a que este trastorno se hereda se debe examinar a los niños con TEA en busca del X frágil, especialmente si los padres desean tener más hijos.

➤ **Factores Ambientales**

En medicina “ambiente” se refiere a cualquier cosa fuera del cuerpo que pueda afectar la salud. Esto incluye el aire que respiramos, el agua que bebemos, los alimentos que ingerimos, etc.

Como los genes, es probable que más de un factor ambiental esté involucrado en aumentar el riesgo del TEA, al igual que con los genes, cualquiera de los factores aumentaría el riesgo en una cantidad mínima. Actualmente se está estudiando la forma de que ciertos factores medioambientales pueden afectar a ciertos genes, activándolos, desactivándolos, aumentando o disminuyendo su actividad normal. Esta división toma en cuenta el papel que juega los elementos tanto esenciales como potencialmente tóxicos en el organismo del individuo. ^[10]

Otras hipótesis de las posibles causas incluyen:

➤ **Componente Cerebro**

Muchas investigaciones han demostrado que hay interrupciones a nivel cerebral en niños con TEA. Existen partes del cerebro que están sobre-conectadas y otras que no están suficientemente conectadas. Esta teoría puede explicar porque hay personas con autismo que tienen habilidades normales o superiores en ciertas áreas, y otras áreas las tienen totalmente subdesarrolladas. Se ha demostrado además, que las personas con TEA procesan la información en otras partes del cerebro que las personas típicas.

➤ **Componente Inmunización**

Son muchos los padres que sostienen que sus hijos no han tenido ningún síntoma de autismo antes de recibir ciertas vacunas. Las vacunas contra la varicela, las paperas y la rubeola, son las incriminadas con este hecho, ya que estas contienen thimerosal, un compuesto que dentro de su estructura contiene Hg, metal potencialmente tóxico para el organismo el cual se asocia como posible influencia o causa de trastornos neurológicos, los cuales influyen en el desarrollo.

➤ **Componente Sistema Inmunológico**

Aunque el TEA se da por una falla en el cerebro, en los estudios hechos por el instituto UC Davis Center for Children's Environmental Health se realizaron comparaciones entre las células del sistema inmunológico de un niño regular y las de un niño diagnosticado con TEA. En estos estudios se ha mostrado que hay diferencias en la manera de reaccionar ante las baterías. Los niños con TEA tienen un nivel más reducido de citosinas, que son las moléculas proteicas que regulan la función de las células y que son responsables de la comunicación intercelular, las cuales, influyen el comportamiento y el estado psíquico. ^[18]

2.7 Importancia de los elementos traza en el organismo

Como se mencionó anteriormente, los factores ambientales han sido señalados como una de las posibles causas de los TEA, estos factores están asociados directamente a la cantidad de elementos tanto esenciales como potencialmente tóxicos presentes en el organismo ya que muchos estudios indican que los niños autistas presentan mayor absorción de elementos potencialmente tóxico que de elementos esenciales.

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. ^[24]

Se definen como elementos traza aquellos que estén presentes en algún tejido en cantidades oscilando de picogramos a microgramos por gramo de tejido húmedo. 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 potencialmente tóxicos.

Los oligoelementos o elementos esenciales, 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. Para que un elemento se considere esencial, este debe cumplir cuatro condiciones:

- La ingesta insuficiente del elemento provoca deficiencias funcionales, reversibles si el elemento vuelve a estar en las concentraciones adecuadas.
- Sin el elemento, el organismo no crece ni completa su ciclo vital.
- El elemento influye directamente en el organismo y está involucrado en sus procesos metabólicos.
- El mismo efecto en el organismo no puede ser conseguido por ningún otro elemento.

Los elementos no esenciales o potencialmente tóxicos son aquellos capaces de causar efectos indeseables en el metabolismo, aun en concentraciones bajas. Los

metales pesados (cuya densidad es elevada) son considerados elementos no esenciales, sin embargo muchos de los metales que tienen una densidad alta nos son especialmente tóxicos y algunos son elementos esenciales para el ser humano, independientemente de que a determinadas concentraciones puedan ser tóxicos. La toxicidad de un metal depende de la dosis en que se ingiera así como de la cantidad excretada del mismo y representan un riesgo para la salud si se da el caso de que no los hemos eliminado de nuestro cuerpo o bien están ya adheridos a órganos o tejidos. Algunos de los elementos no esenciales son: Al, As, Cr, Cd, Hg y Pb. Estos pueden encontrarse en el agua y alimentos que consumimos, así como también en el aire que respiramos, además algunas partículas de estos elementos pueden ser absorbidas por los poros de nuestra piel. ^[42,43]

Cualquier elemento, sea esencial o no, puede ser tóxico a partir de unas determinadas concentraciones. Para cada elemento esencial existe un rango de concentraciones considerado óptimo para un organismo. En este rango se alcanza una concentración con la que se pueden desarrollar correctamente las funciones que dependen de ese elemento, pero no es excesivamente alta como para que produzca efectos tóxicos. Por debajo de este rango se produce la deficiencia en ese elemento, lo que conlleva la aparición de efectos patológicos o incluso la muerte del organismo. Por encima del rango óptimo también aparecen efectos patológicos o muerte del organismo derivados de la toxicidad del elemento.

En un organismo, los niveles óptimos de un elemento se mantienen mediante “mecanismos homeostáticos”. De esta forma se controla la absorción, almacenamiento y excreción de los elementos. Sin embargo, se puede producir déficit o exceso debido a la dieta, a problemas en los mecanismos de absorción, etc. La figura 2 muestra una representación cualitativa de la respuesta de un organismo frente a la dosis de un elemento químico. ^[44]

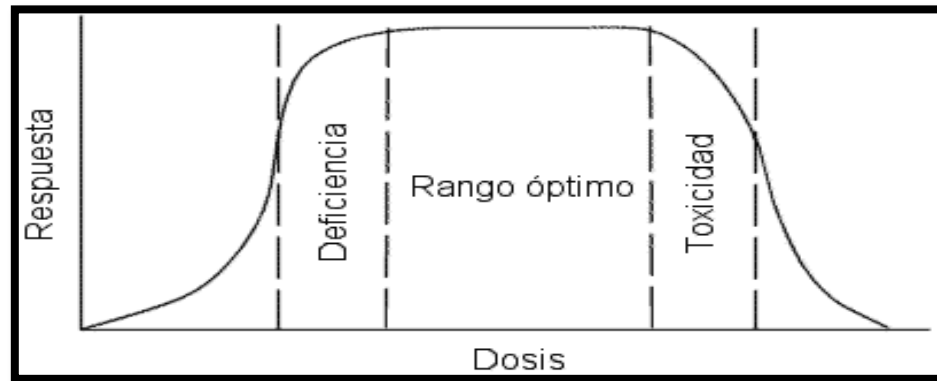


Figura 2. Representación cualitativa de la respuesta de un organismo frente a la dosis de un elemento químico.

A continuación se resumen algunas de las funciones en el organismo que cumplen los elementos esenciales que se analizaron en esta investigación.

➤ **Magnesio:** El magnesio iónico (Mg^{2+}) representa el segundo catión más importante del sector intracelular después del potasio, el 70% de la cantidad presente en el cuerpo se encuentra en los huesos. El Mg estimula la actividad de las cinasas, enzimas que manejan ATP, al formar complejos con los grupos fosfato, además participa en la transmisión de los impulsos nerviosos, en la contracción y relajación de músculos, en el transporte de oxígeno a nivel tisular, regula el ritmo cardiaco, ayuda a regular los niveles de azúcar en la sangre, a mantener normalizados los niveles de colesterol, actúa sobre el sistema neurológico favoreciendo el sueño y la relajación, ayuda a la distribución de minerales a través de las membranas celulares, mejora la circulación y el estado de los nervios por lo que facilita la audición. Su déficit puede ocasionar entre otras cosas: debilidad muscular, falta de concentración y reflejos, alteraciones de la conducta, síntomas de esquizofrenia, apatía, convulsiones y epilepsia. ^[25]

➤ **Hierro:** Es un mineral presente en cada célula del cuerpo y necesario para una amplia variedad de funciones biológicas, participa en la producción de las

proteínas hemoglobina que se encuentra en los glóbulos rojos y mioglobina encontrada en los músculos, ambas transportadoras de oxígeno; además tiene un papel fundamental en la síntesis del ADN. Los niveles bajos de este elemento durante un período de tiempo prolongado pueden llevar a que se presente anemia ferropénica. Los síntomas abarcan falta de energía, dificultad para respirar, dolor de cabeza, irritabilidad, vértigo o pérdida de peso.^[26]

➤ **Calcio:** Es el elemento más abundante en el organismo, además de estar presente en los tejidos sólidos, el calcio se encuentra en el plasma sanguíneo y en los líquidos intestinales. Su papel principal en el organismo humano consiste en la construcción de huesos y los tejidos del corazón, pero también participa en la coagulación de la sangre, en la excitabilidad neuromuscular, es el trasmisor del impulso nervioso en las fibras sensitivas y motoras, y es el activador de numerosos sistemas enzimáticos además de ser el cicatrizante del cuerpo. Su deficiencia es uno de los factores que intervienen en el desarrollo de la osteoporosis en una etapa de la vida.^[17]

➤ **Cobre:** Es uno de los componentes de la sangre, de las enzimas y varias proteínas. El Cu participa activamente en la síntesis de la hemoglobina, es necesario para la formación y el mantenimiento de los huesos, su presencia es necesaria para que el organismo pueda utilizar la tirosina facilitando con eso la pigmentación de la piel y el cabello, su presencia evita la excesiva coagulación de la sangre, es necesario para el correcto funcionamiento del tiroides, ayuda a regular los niveles de colesterol en la sangre, interviene en la formación del ARN. Su déficit puede provocar crecimiento deficiente, alteraciones en el sistema nervioso, retención de líquidos, desmineralización ósea y anemia en niños. Su dosis debe ser controlada, pues a pesar de ser un elemento esencial, las altas concentraciones del mismo resultan dañinas para el organismo humano, pudiendo ocasionar anemia, daño del hígado, daño del riñón e irritación de los intestinos y del estómago.^[27]

➤ **Zinc:** Se encuentra en las células por todo el cuerpo, es un componente esencial de más de 300 metaloenzimas que participan en las vías metabólicas principales. Por lo que es un nutriente indispensable para la salud humana y animal. Es necesario para que el sistema de defensa del cuerpo (sistema inmunitario) trabaje apropiadamente. Juega un papel en la división y crecimiento de las células, al igual que en la cicatrización de heridas y en el metabolismo de los carbohidratos, también es necesario para los sentidos del olfato y del gusto, y para el correcto desarrollo del sistema nervioso, ayuda a mantener las funciones oculares normales, ayuda a la cicatrización de las heridas y además es un potente antioxidante natural. La falta de Zn puede provocar, entre otros, baja tasa de crecimiento, alteraciones mentales, alteraciones en la forma y función de los órganos reproductores masculinos.^[24]

2.8 Estrés Oxidativo

Los malos hábitos alimenticios o estar sometido bajo una dieta estricta pueden ser una de las causas para que se presente una deficiencia de elementos esenciales, además son unos de los factores principales que contribuyen a la aparición del estrés oxidativo.

El estrés oxidativo ocurre cuando hay un desequilibrio entre la producción de especies reactivas al oxígeno y los sistemas de defensa antioxidante, o lo que es igual, es un desequilibrio en nuestras células generado por un aumento de radicales libre. Esto ocurre debido a la carencia de vitaminas y elementos esenciales, procesos inflamatorios, deficiencia del sistema inmune y/o factores ambientales.^[28]

2.9 Muestras biológicas empleadas en el análisis de elementos traza en niños con TEA

Debido al crecimiento progresivo del estudio de los elementos traza se han empleado diferentes tipos de muestras para llevar a cabo el seguimiento y correlacionar las concentraciones encontradas con la patología en estudio. Entre los diferentes tipos de muestras biológicas empleadas se pueden mencionar: la orina, el cabello, la sangre y el suero sanguíneo; cuyas propiedades para tal análisis se describen a continuación.

2.9.1 Sangre

Es un tejido líquido que recorre el organismo transportando células y todos los elementos necesarios para realizar las funciones vitales para la vida. Es impulsada por el corazón y circula a través de los vasos sanguíneos.^[30] Algunas de sus funciones son: transportar a las células elementos nutritivos y oxígeno y extraer de las mismas productos de desechos, transportar hormonas, o sea las secreciones de las glándulas endócrinas e intervenir en el equilibrio de ácidos, bases, sales y agua en el interior de las células.^[31]

La sangre humana está compuesta por dos fracciones: plasma y elementos formes.

➤ **Plasma Sanguíneo:** Es la parte líquida de la sangre, traslúcida y de color amarillo en la que se encuentran los glóbulos rojos, blancos y las plaquetas. Contiene fibrina y otros factores de coagulación. Se ocupa de trasladar los glóbulos que se encuentran en ella (componentes celulares de la sangre) y, además, es el sistema que transporta varios elementos desde y hacia las células. Cuando se elimina los factores de coagulación como la fibrina, el plasma pasa a ser suero sanguíneo, el cual se describirá en la sección 2.9.2.

Elementos Formes

- **Glóbulos rojos o eritrocitos:** Son células en forma de disco bicóncavo que no tienen núcleo. Se producen en la médula ósea y son los encargados de transportar el oxígeno desde los pulmones a las células de todos los tejidos del organismo. Contienen una proteína llamada hemoglobina que le confiere el color rojo característico a la sangre.
- **Glóbulos blancos o leucocitos:** Son células defensivas que forman parte del sistema inmunológico. Tienen la función de combatir microorganismos y cuerpos extraños. A diferencia de los glóbulos rojos, los blancos no funcionan dentro del torrente sanguíneo, pero lo utilizan para desplazarse.
- **Plaquetas o trombocitos:** Son partículas (no propiamente células) que participan en la coagulación de la sangre. Son necesarias para taponar rápidamente las heridas e impedir hemorragias. Se fabrican en la médula ósea. Son de forma oval y no tienen núcleo. ^[32] La figura 3 muestra una representación de la sangre y sus componentes.

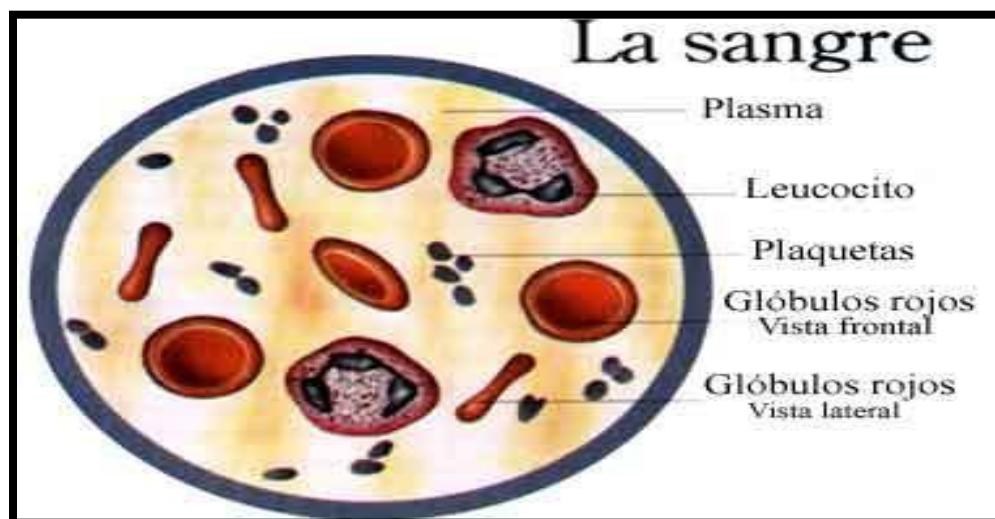


Figura 3. Componentes de la Sangre.

2.9.2 Suero Sanguíneo

Es la fracción fluida que se obtiene cuando se coagula la sangre y se consume los factores de la coagulación, es esencialmente función del plasma y no de los elementos formes; comprende la transformación de una de las proteínas plasmáticas (el fibrinógeno) en fibrina insoluble. El coágulo sucesivamente se contrae y deja salir un líquido amarillo llamado suero, similar al plasma en muchos aspectos, pero sin poder de coagulación por faltarle el fibrinógeno. El suero sanguíneo es principalmente agua, de un color amarillento puesto que se disuelve con proteínas, hormonas, minerales y dióxido de carbono, así como también es una fuente muy importante de electrolitos. ^[17]

La sangre, y en especial el suero sanguíneo es un sistema que suministra a los tejidos oligoelementos. Los metales circulan por la sangre durante aproximadamente 72 horas, transcurridas las cuales se eliminan de forma natural o quedan depositados en diversos tejidos del organismo.

Unos niveles elevados de metales en la sangre son indicio de una exposición inmediata a ellos y de intoxicaciones agudas. La reducción de las concentraciones de elementos esenciales refleja un aporte inadecuado y puede indicar una deficiencia nutricional. ^[33]

2.9.3 Cabello

Es una continuación del cuero cabelludo, formada por una fibra de queratina y constituida por una raíz y un tallo. Cada uno de los pelos consiste en una raíz ubicada en un folículo piloso y en un tallo que se proyecta hacia arriba por encima de la superficie de la epidermis.

La zona papilar o papila dérmica está compuesta de tejido conjuntivo y vasos sanguíneos, que proporcionan al pelo las sustancias necesarias para su crecimiento. ^[34]

El tallo es la parte visible. La parte invisible, debajo de la piel, o sea la raíz, se compone de un folículo insertado en un bulbo; este bulbo es el medio de nutrición del folículo. El folículo piloso es el generador de las células madres que hacen crecer el cabello, y es una de las partes más dinámicas y activas del organismo. Este folículo es alimentado también con sebo producido por las glándulas sebáceas, ubicadas a sus costados, que le proporciona elasticidad y flexibilidad al pelo. ^[35] Las fases del cabello pueden ser observadas en la figura 4.

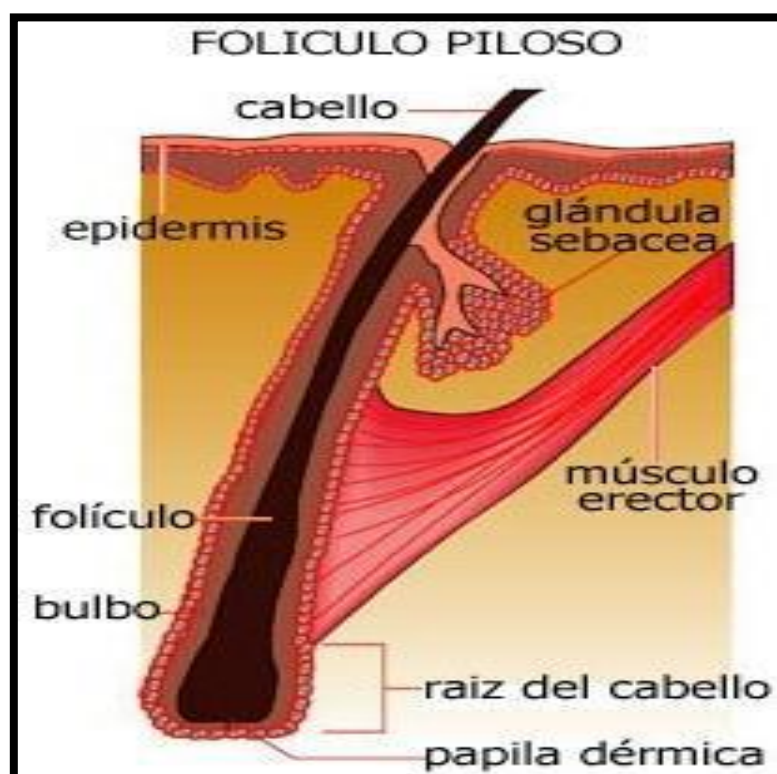


Figura 4. Fases del Cabello.

El cabello es el medio ideal para la medición de los elementos potencialmente tóxicos y esenciales, porque es el único que “almacena” elementos durante periodos largos. Al crecer, la raíz es alimentada por los vasos sanguíneos, y esta sangre transporta los elementos potencialmente tóxicos y esenciales presentes en el organismo. Estos elementos se incorporan entonces a las proteínas del cabello en

proceso de crecimiento. ^[36] En general, la cantidad de elementos esenciales incorporados de forma irreversible en el cuero cabelludo es proporcional a la concentración de los mismos en otros tejidos del organismo. De esta forma, el análisis de elementos en el cabello nos proporciona información para determinar la situación fisiológica en nuestro organismo de dichos minerales, sea en exceso, déficit o mala distribución. ^[37]

2.9.4 Orina

Es un líquido acuoso transparente y amarillento, de olor característico, secretado por los riñones y eliminado al exterior por el aparato urinario. Su densidad y cantidad dependen de cada organismo, su equilibrio, de la cantidad de agua ingerida y las actividades realizadas. A través de la orina eliminamos residuos del trabajo celular, sustancias indeseables y el exceso de agua en la sangre.

Por lo general, la orina de una persona sana está compuesta en un 95% por agua, la que a su vez contiene sustancias disueltas que el cuerpo no necesita y desecha. Destacan la urea (sustancia formada en el hígado derivada de la destrucción de las proteínas) que alcanza un 3%, mientras que el 2% restante corresponde a sustancias minerales, como el potasio, sodio, cloro, iones de fosfato y sulfato, ácido úrico y creatinina (desecho de la creatina, elemento muscular) siendo esta última útil para monitorear el correcto funcionamiento de los riñones, pudiéndose expresar la concentración de un metal por gramos de creatinina en la orina, lo que hace posible observar si la excreción del metal mediante la orina es por el mal funcionamiento de los riñones o por acumulación de este metal en el organismo. En otras palabras, la orina es útil para determinar la carga metálica renal. ^[24,45]

2.10 Intervalos de referencia de los elementos Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Al, Cr y Pb en suero sanguíneo y cabello

Los valores de los intervalos de referencia reportados en esta investigación para el caso del suero sanguíneo corresponden a lo establecido según la Organización Mundial para la Salud, además éstos son utilizados por distintos laboratorios clínicos en el país, y comprobados para el caso del Zn, Fe y Cu con estudios realizados en Venezuela. [39, 40, 41]

Por otro lado, los valores de los intervalos de referencia para el cabello son representativos de una población control y han sido determinados por los Laboratorios extranjeros como Docto's Data, Inc. (Illinois, Estados Unidos); y Micro Trace Minerals (Hersbruck, Alemania), pues no existen valores de referencia nacionales establecidos con seguridad para este tipo de muestra. Además, es importante mencionar que estos pueden variar según la región. [17, 19, 33]

La tabla 1 muestra los valores de los intervalos de referencia para los elementos Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Al, Cr y Pb en suero sanguíneo y cabello.

Tabla 1. Intervalos de referencia de Ca, Mg, Fe, Zn, Cu, Al, Cr y Pb en suero sanguíneo y cabello.

Elemento	Tipo de Muestra	
	Suero Sanguíneo (mg/L)	Cabello (mg/Kg)
Ca	85 – 102	110 -510
Mg	16 – 26	15 – 56
Fe	0,5 -1,2	8 – 15
Zn	0,7 – 1,2	110 -228
Cu	0,7 – 1,6	8 – 37
Al	< 0,01	< 8
Cr	< 0,02	< 0,6
Pb	< 0,25	< 3

2.11 Limitaciones presentes al trabajar con muestras biológicas

Las muestras biológicas analizadas en esta investigación fueron suero sanguíneo y cabello, las cuales cuentan con una serie de limitaciones que deben tomarse en cuenta al momento del análisis con el fin de obtener resultados óptimos. Entre las limitaciones se encuentran:

- Cantidad limitada.
- Dificultad de adquisición.
- Baja concentración de los analitos.
- Requerimiento de reactivos puros.
- Limpieza profunda del material de laboratorio.
- En el caso de la sangre, puede presentarse la hemólisis, que no es más que la desintegración o descomposición de los glóbulos rojos ocasionada generalmente por: exceso en la velocidad de succión de la muestra, uso de agujas, jeringas y/o recipientes húmedos y vaciado inadecuado de la jeringa; lo cual genera contaminación del suero sanguíneo e interfiere en la medición de analitos.
- Con respecto al cabello, puede presentarse contaminación exógena como consecuencia de un mal lavado interfiriendo en medida de la concentración del analito.

2.12 Técnicas analíticas empleadas para la determinación de elementos traza en cabello y suero sanguíneo de niños con TEA

Por excelencia y debido a sus múltiples ventajas, los estudios basados en la determinación de elementos traza en muestras de origen biológico de niños con TEA se realizan empleando como técnica de análisis la Espectrometría con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP), la cual engloba dos técnicas:

- Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES).
- Espectrometría de Masas con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-MS).

La espectrometría con ICP es una de las herramientas más poderosas y populares en la química analítica para la determinación de elementos traza en muchos tipos de muestras. La técnica se basa en la vaporización y atomización de analitos tras una descarga de radiofrecuencia. Las muestras líquidas y gaseosas son inyectadas directamente al instrumento, mientras que las muestras sólidas requieren de extracción o digestión ácida de manera que los analitos estén presentes en una solución.

Algunas características más resaltantes del ICP es su capacidad para generar una vaporización eficiente y reproducible, además de la atomización, excitación e ionización de una amplia gama de elementos y las altas temperaturas que alcanza el ICP hace posible la excitación de elementos refractarios. El ICP permite analizar simultáneamente más de 70 elementos de la tabla periódica, posee una alta densidad electrónica, bajo ruido, interferencia química de bajas a inexistentes, alta estabilidad lo que conlleva a una buena precisión, excelentes límites de detección para la mayoría de los elementos y amplio rango dinámico lineal (de cuatro a seis órdenes de magnitud).^[23]

Un plasma, es una mezcla gaseosa conductora de electricidad que contiene una concentración significativa de cationes y electrones, dicha concentración es tal que la carga neta es cero. El origen de la emisión continua proviene aparentemente de la recombinación de los elementos con el argón y otros iones. En el plasma de argón empleado frecuentemente en los análisis, 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.

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. En la figura 5 se muestra una fuente de plasma de acoplamiento inductivo típica llamada antorcha. [23]

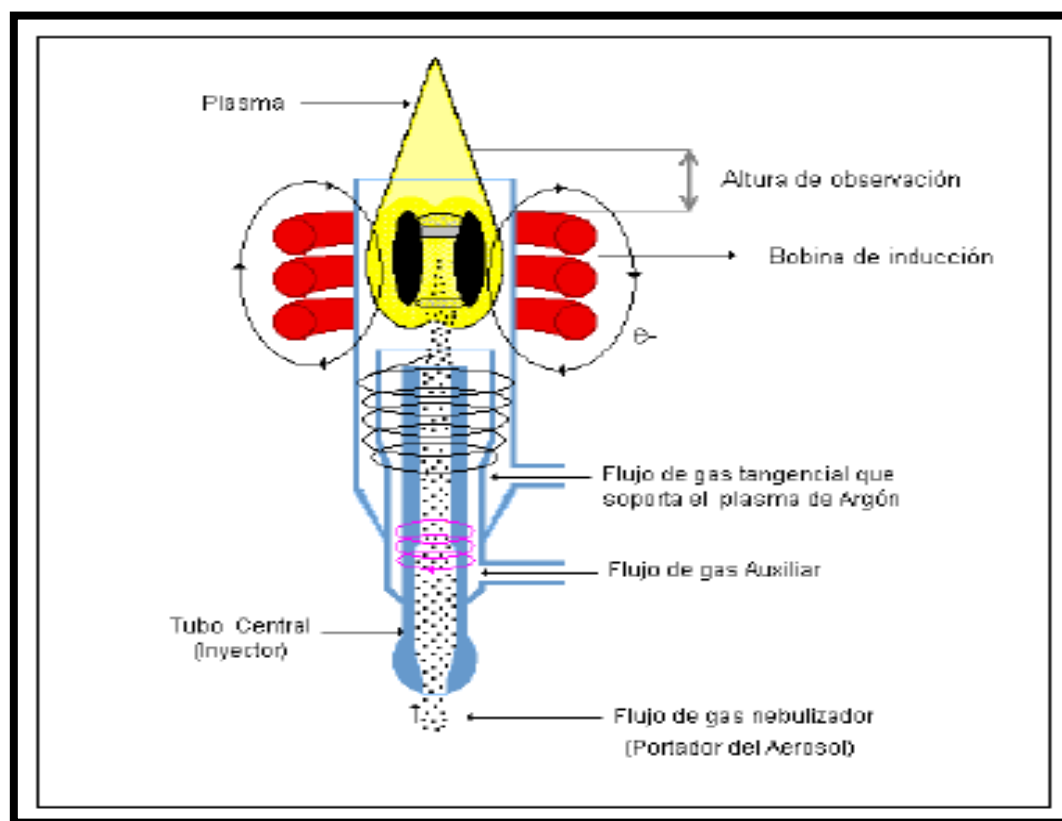


Figura 5. Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo.

En la espectrometría con ICP, la muestra en solución se trasporta al instrumento mediante el impulso de una bomba peristáltica, el líquido se convierte en un aerosol a través de un proceso llamado nebulización y es dirigido hacia el canal central del plasma, el núcleo del plasma inductivamente acoplado puede alcanzar una temperatura de 10.000K, de modo que el aerosol es desolvatado, vaporizado, y atomizado

rápidamente, liberándose los analitos como átomos libres en estado gaseoso. El plasma imparte energía para que se lleve a cabo la colisión de los átomos y su promoción a estados excitados, a menudo esta energía es suficiente para convertir los átomos a iones y posteriormente promover estos iones a estados excitados. Tanto las especies atómicas como iónicas que se encuentran en estados excitados pueden relajarse al estado fundamental emitiendo un fotón. Es a partir de este momento que las dos técnicas difieren.

2.12.1 Espectrometría de Masas con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-MS)

Mide las masas de los iones de los elementos generados por el plasma de argón de alta temperatura. Estos iones son dirigidos a través de un espectrómetro cuadrupolo de masas. El cuadrupolo filtra los iones en función de su relación masa-carga (m/z); (haciendo que esta técnica sea especialmente adecuado para los estudios de relación de isótopos) de modo que solo los iones con una m/z específica alcanzan el sistema de detección de multiplicador de electrones. La intensidad de la señal para un ion analito dado es proporcional a su concentración en la solución. La concentración de la solución se utiliza entonces para calcular la fracción de masa del analito en la muestra que está siendo analizada.

2.12.2 Espectrometría de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES)

Mide la luz emitida en longitudes de onda características de los iones analitos térmicamente excitados. Esta luz emitida se separa y se mide en un espectrómetro,

obteniéndose una medición de la intensidad que se puede convertir a una concentración elemental por comparación con estándares de calibración.

Los fotones provenientes de la relajación al estado fundamental de las especies atómicas o iónicas excitadas por el plasma tienen energías características y únicas para cada elemento, entonces, la longitud de onda de los fotones se puede utilizar para identificar los elementos que los originaron, el número total de fotones es directamente proporcional a la concentración del elemento originario de la muestra; una porción de los fotones emitidas por el ICP es colectada por un lente o un espejo cóncavo formándose una imagen focalizada en la entrada de un dispositivo de selección de longitud de onda tal como un monocromador. La longitud de onda particular que sale del monocromador se convierte en una señal eléctrica mediante un fotodetector. La señal se amplifica y se procesa por detectores electrónicos siendo finalmente mostrada y almacenada en la computadora.

En esta investigación se empleó el ICP-OES, y una representación típica de la disposición de los componentes de este equipo puede observarse en la figura 6. ^[21,22]

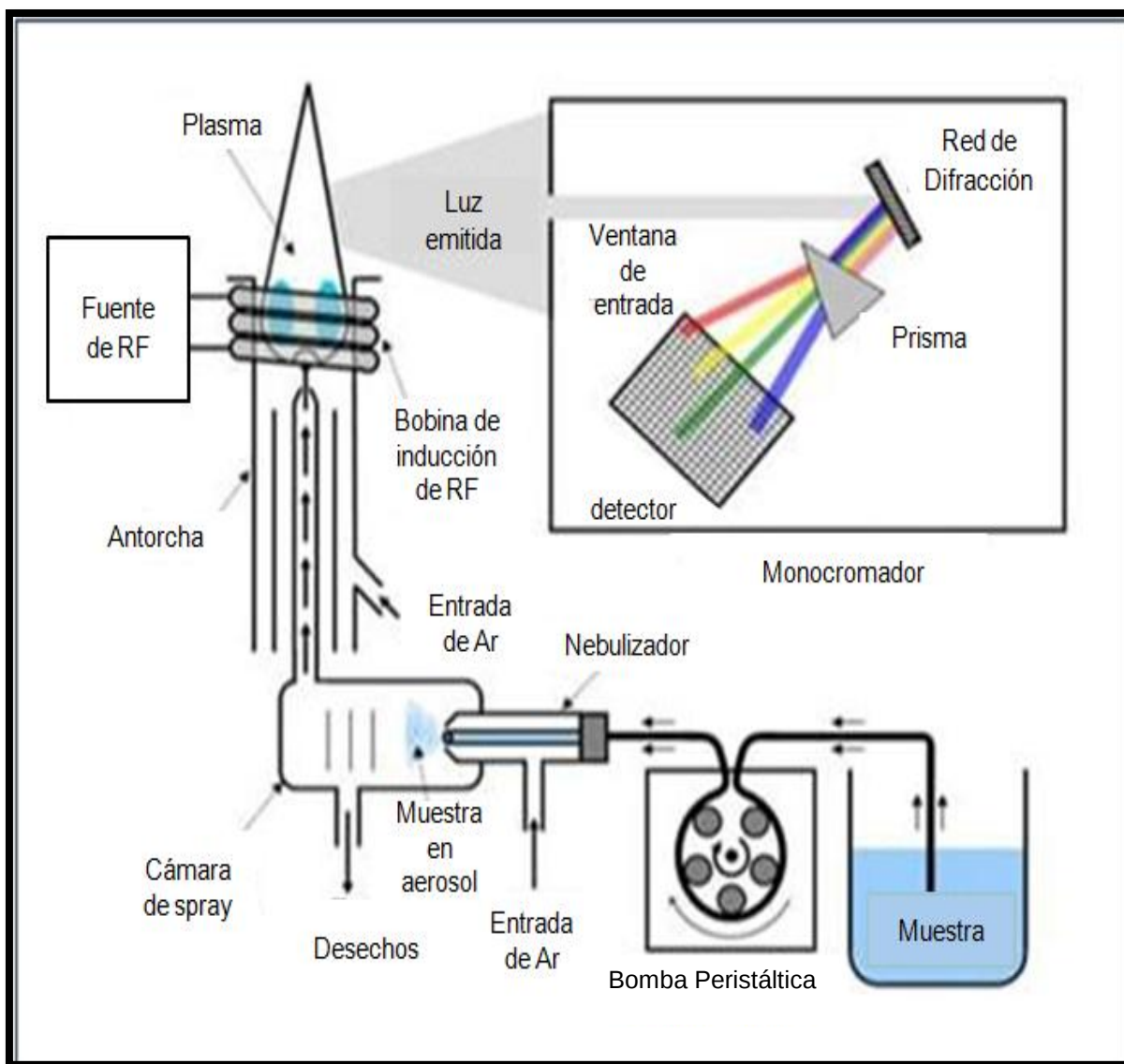


Figura 6. Componentes de un ICP-OES.

3. ANTECEDENTES

Debido al incremento en la incidencia del autismo, son muchas las investigaciones que se han venido realizando a nivel mundial con el objetivo de establecer relaciones metal-autismo, mejorar los tratamientos establecidos y contribuir con el diagnóstico temprano del síndrome. A continuación, se muestra un resumen de algunas de estas investigaciones desarrolladas en los últimos años.

➤ Russo A. y DeVito R. (2011), evaluaron la concentración de Zn y Cu en muestras de suero sanguíneo de 152 niños y adolescentes con TEA, dividiéndolos de acuerdo al trastorno que presentaban en 3 grupos: autismo, asperger y trastorno generalizado de desarrollo no especificado (TGD-NE). Los síntomas de tales trastornos fueron evaluados mediante un cuestionario llenado por los padres o cuidadores de los niños donde calificaban en una escala de 0 a 5 (siendo 5 la gravedad más alta) la gravedad de síntomas como: conciencia, lenguaje expresivo y receptivo, atención, hiperactividad, habilidades motrices, contacto visual, sensibilidad táctil y auditiva, impulsividad y lenguaje pragmático. Los investigadores observaron que el grupo con autismo y TGD-NE presentaron niveles elevados de Cu. Todos los grupos fueron prescritos con la dosis apropiadas de anti-oxidantes (vitamina C, E, B-6, Mg, y un suplemento de Zn como Zn picolinato) los cuales debían ser tomados al menos durante 8 semanas, esto con el objetivo de contrarrestar los altos niveles de Cu y evaluar el efecto de dichos medicamentos en el organismo. Después del tratamiento con anti-oxidantes, Russo y DeVito notaron disminución en la concentración de Cu y una considerable elevación del nivel de Zn en los 3 grupos, estos resultados son mostrados en la figura 7.

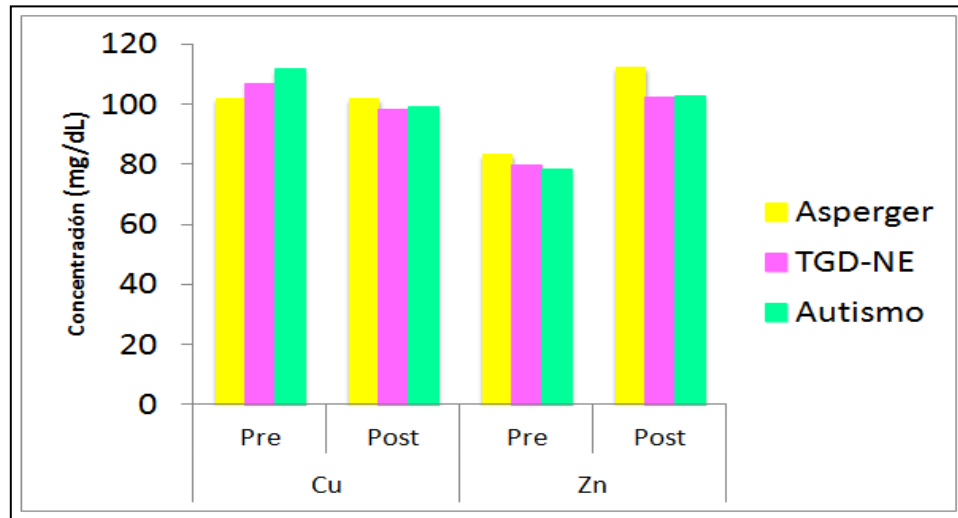


Figura 7. Niveles de Zn y Cu antes y después del tratamiento con antioxidantes. Russo A. y DeVito R.

Además el grupo con autismo presentó disminución en la severidad de síntomas como: lenguaje receptivo, enfoque y atención, hiperactividad, sensibilidad (auditiva y táctil) y contacto visual. En los individuos con asperger ningún síntoma mejoró, pero después del tratamiento ningún síntoma empeoró en ninguno de los 3 grupos. Concluyeron que existe una relación directa entre los niveles de Zn-Cu con el autismo, y que estos niveles pueden normalizarse en pacientes con autismo y TGD-NE después de un tratamiento a base de anti-oxidantes; al no observarse variación en los individuos con asperger puede entonces confirmarse la existencia de una relación entre los niveles de Cu en el cuerpo y la severidad del trastorno.^[20]

➤ Adams. J., et. al. (2011), realizaron un estudio aleatorio del tipo “doble ciego” para evaluar los efectos de un suplemento de vitaminas y minerales en niños y adultos con autismo. Trabajaron con dos grupos de personas: un grupo local de Arizona constituido por 88 participantes con edades comprendidas entre 5-16 años y un grupo nacional de 53 participantes, incluyendo niños y adultos con edades entre 3-60 años;

éste amplio rango de edades en el grupo nacional fue con el objetivo de determinar si el efecto del suplemento en los síntomas dependen de la edad. Por otro lado, para el grupo de Arizona, tomaron muestras de sangre y orina antes y después del estudio para evaluar el estado nutricional y metabólico, comparándose finalmente los resultados con los obtenidos de un grupo de niños control. Todos los participantes estaban diagnosticados médicamente, además, dos meses previos al estudio ninguno había tenido cambios en la dieta o tratamiento, no habían consumido suplementos de vitaminas y minerales ni se habían sometido a tratamientos de quelación.

Tanto el suplemento como el placebo fueron elaborados por el mismo laboratorio, y empacados exactamente igual de manera que los pacientes no pudieran notar ninguna diferencia.

Los participantes recibieron suplemento o placebo que debían tomar 3 veces al día con cada comida durante 3 meses, y la severidad de los síntomas se midió a través de cuestionarios realizados a los padres antes, durante y después del estudio. Adams y sus colaboradores encontraron que: al inicio del estudio, los niños con autismo poseía diferencias estadísticamente significativas en su estado nutricional y metabólico en comparación con los niños control, incluyendo: los bajos niveles de biotina, glutatión, ATP, NADH, NADPH, sulfato en plasma; también altos niveles de los biomarcadores de estrés oxidativo, y evidencia de una metilación alterada (alta uridina), al final del tratamiento, todos los niveles de estos biomarcadores mejoraron o incluso alcanzaron valores normales. Encontraron también, que los niveles de varias vitaminas y minerales se asociaron fuertemente a la severidad de los síntomas del autismo, ya que estas actúan como cofactores de reacciones enzimáticas en el cuerpo, por lo tanto bajos niveles de ellos pueden ocasionar deterioro en el funcionamiento metabólico, además muchas variaciones genéticas afectan la actividad enzimática generando una mayor necesidad de vitaminas y minerales para el funcionamiento metabólico normal. Los cuestionarios realizados a los padres, indicaron que el grupo con suplemento tuvo mejoras significativamente mayores que el grupo con placebo, tal como lo esperaban. Las mejoras se presentaron en la hiperactividad, rabietas y lenguaje receptivo, esto

puede deberse a que las vitaminas y minerales se requieren como cofactores para la producción de muchos neurotransmisores y sus precursores, así que, el suplemento de vitaminas y minerales pueden también haber afectado un estado neurotransmisor que puede haber contribuido a las mejoras en la severidad del autismo y en sus síntomas en general. Finalmente el suplemento de vitaminas y minerales fue generalmente bien tolerado, aunque no ayudará a todos los niños y adultos, un porcentaje significativo es susceptible a presentar mejoras después de solo 3 meses, por lo que estos investigadores creen que un uso más prolongado podría generar mayores beneficios, además que puede ser utilizado en combinación en combinación de otras terapias como de lenguaje y comportamiento en pro de disminuir la severidad de los síntomas de los trastornos del espectro autista. ^[16]

➤ Blaurock-Busch, E., et. al. (2012), evaluaron los niveles de 20 elementos (potencialmente tóxicos y esenciales) en muestras de cabello de 44 niños con autismo cuyas edades estaban comprendidas entre 3 y 9 años, a fin de determinar si presentaban exceso o deficiencia en la carga metálica y si estos niveles podían correlacionarse con la severidad del autismo. Ellos encontraron que en comparación con un grupo de niños control con edades similares, los niños con autismo presentaron alta concentración o exceso de los elementos potencialmente tóxicos como: Al, As, Cd, Hg, Sb, Ni, Pb y V; los elementos esenciales Ca, Fe, I, Mg, Mn, Se y Zn fueron considerados como deficientes y la concentración de Cu excedió los valores de referencia.

Por otro lado, las altas concentraciones de Pb, Hg, Cr, y Ni en el cabello se asociaron con la comunicación verbal, la respuesta auditiva, el sentido del olfato y la comunicación no verbal respectivamente. Con respecto a las deficiencias, encontraron que las de Se y Zn se asocian con la incapacidad de adaptarse a los cambios y con el miedo y el nerviosismo respectivamente. Concluyendo que la exposición a metales tóxicos en combinación con un estado nutricional inadecuado es una de las causas probables del TEA, ya que los datos obtenidos con esta investigación apoyan la

evidencia histórica de que los metales pesados, especialmente el Pb desempeñan un papel importante en el desarrollo de diversos trastornos, además, la deficiencia de elementos esenciales podría aumentar potencialmente la toxicidad de los metales pesados, y a su vez los metales pesado podrían afectar la buena absorción de los elementos esenciales, por último, añaden que el análisis en el cabello es de gran utilidad para la determinación de elementos potencialmente tóxicos y esenciales ofreciendo una oportunidad para la detección temprana del TEA.^[19]

➤ Al-Farsi, Y., et. al. (2012), compararon la concentración de elementos potencialmente tóxicos y elementos esenciales en muestras de cabello de 27 niños con autismo con la de 27 niños control. Encontrando diferencias significativas en cada uno de los metales analizados. Con respecto a los niños control, el grupo de niños con autismo presento niveles de concentración elevada para los elementos potencialmente tóxicos y para varios elementos esenciales como: Mg, Zn y Fe. En contraste los niveles de Ca y Cu fueron significativamente menores. Estos resultados se encuentran resumidos en la tabla 2.

Tabla 2. Mediana de los niveles de elementos potencialmente tóxicos y elementos esenciales en muestras de cabello. Investigación de Al-Farsi, Y.

Elemento	Mediana Autismo	Mediana Control	Elemento	Mediana Autismo	Mediana Control
Elementos Potencialmente Tóxicos					
Pb	12,2	6,3	Cd	7,4	3,0
Al*	2,3	1,2	Co	14,7	6,1
Cr	23,6	9,9	Ni	11,6	5,6
Elementos Esenciales					
Mg*	4,3	1,8	Cu	1,2	6,6
Ca*	1,66	8,9	Fe	91,3	46,3
Zn*	5,4	2,9	K*	16,8	11,6
Na*	47,4	30,5	Mn	0,82	0,90

Unidades = µg/g

* Por 100 unidades de medida.

Los resultados encontrados con este estudio son consistentes con la sugerencia de que niveles incorrectos en la concentración de elementos tanto esenciales como tóxicos actúan como posibles contribuyentes del autismo, reforzando con esto la conciencia acerca de la importancia de un estado nutricional adecuado y la prevención a la exposición de toxinas ambientales.

Al-Farsi asocia los niveles elevados de elementos potencialmente tóxicos con la exposición excesiva a toxinas ambientales y a una mayor absorción de los mismos por parte de los niños autistas ya que existen suficientes evidencias de que los niños con TEA muestran una marcada incapacidad para procesar y eliminar toxinas de cuerpo. Por otra parte asocia los bajos niveles de Ca y Cu con una ingesta nutricional inadecuada debido a la intervención dietética a la que están sometidos los niños con autismo. ^[47]

➤ Yasuda, H., et. al. (2013), determinaron la concentración de 26 elementos trazas en muestras de cabello de 1.967 niños (1.553 niños y 414 niñas) con trastorno autista, cuyas edades estaban comprendidas entre 0 y 15 años. Se encontró que para los metales esenciales: el 29,7% de los niños presentaban deficiencia de Zn y que el 43,5% de esta deficiencia correspondía a niños con edades de 0 a 3 años; el 17,6% de la población total analizada presentó deficiencia de Mg y el 5,8% presentó deficiencia de Ca. En contraste, para los elementos no esenciales observaron exceso en la carga de Al, Cd, y Pb para un 17,2%; 8,5% y 4,8% respectivamente; y una incidencia menor para Hg y As con 2,8% y 2,6%. Concluyendo que, muchos de los pacientes infantiles diagnosticado con autismo sufren de una severa deficiencia de Zn, Mg y/o alta carga de elementos como Al, Cd y Pb lo que sugiere, que la deficiencia infantil de estos elementos puede desempeñar papeles principales en la patogénesis del trastorno del espectro autista. Por otro lado, la susceptibilidad a la deficiencia de Zn observada en los bebés puede estar vinculada a que éstos necesitan mayor cantidad (por Kg de peso corporal) para su desarrollo y crecimiento. Además, los cambios relacionados con la

edad en la producción de proteínas metalotioneínas y diferencias en los niveles de glutatión pueden estar asociados a las diferencias relacionadas con la edad y los requerimientos de Zn. ^[4]

➤ Li, S., et. al. (2014), evaluaron los niveles de Zn y Cu en muestras de suero sanguíneo de 60 niños diagnosticados con autismo y compararon los resultados obtenidos con los de un grupo de 60 niños control. Encontrando que: los niveles significativamente bajos de Zn y altos de Cu en los niños con TEA en comparación a los niños control. En consecuencia, la relación Zn/Cu fue menor en los niños con TEA, y esta relación disminuyó con el aumento de la gravedad del síndrome. La tabla 3 resume los resultados de esta investigación.

Tabla 3. Concentraciones de Zn y Cu en suero sanguíneo de niños autistas y niños control. Investigación de Li, S.

Grupo	Concentración de Zn (mg/dL)	Concentración de Cu (mg/dL)	Relación Zn/Cu
Niños Autistas	78,7	129,9	0,608
Niños Control	87,7	121,2	0,727

Li, asocio la relación Zn/Cu no solo con el nivel clínico del autismo, sino también sugiere que esta puede ser tomada como un riesgo o como indicador de enfermedad, además que esta puede indicar la presencia de estrés oxidativo en el organismo. ^[48]

En el Centro de Química Analítica, de la Universidad Central de Venezuela, se han realizado algunos estudios con niños autistas. A continuación se presenta un resumen de los datos más relevantes.

➤ Rosales, M., (2009), determinó la concentración de Zn, Cu, Pb, Cr, Se, Cd y Hg en muestras de cabello y orina de niños con trastorno autista con edades comprendidas entre 2-15 años. La información adquirida del análisis de las muestras de

cabello fue muy limitada, los niveles de Cu se encontraron por debajo del intervalo de referencia y los niveles de Pb por encima de los mismos. Por otra parte, el análisis de las muestras de orina mostro que los niños autistas excretan menores cantidades de Zn, Se, Cr, Pb y Hg, observándose que la cantidad de Hg excretado aumenta al disminuir la severidad del síndrome. ^[29] La tabla 4 muestran un resumen de los resultados para cabello y orina.

Tabla 4. Concentraciones en muestras de cabello y orina. Rosales, M.

Elemento	Intervalo de Concentración Grupo Autista	Intervalo de Concentración Grupo Control	Mediana Grupo Autista	Mediana Grupo Control	Intervalo de Concentración de Referencia
Concentraciones en muestras de cabello (µg/g)					
Zn	36,86 - 259,69	75,59 – 144,92	120,5	110,20	140 – 220
Cu	3,51 – 62,84	3,35 - 6,89	5,70	4,84	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	1,43	< 0,60
Hg	0,0008 - 2,9727	0,13 - 0,84	0,1771	0,50	< 0,80
Cd	< LD - 0,42	< LD	< LD	ND	< 0,050
Concentraciones en muestras de orina (µg/24h)					
Zn	2,96 – 983,19	22,41 – 362,26	124,2	223,4	120-1300
Cu	6,44 – 102,44	4,09 – 62,09	35,62	34,43	11 – 68
Cr	1,67 – 48,09	5,76 – 63,51	17,55	37,98	20 – 114
Se	21,3 -667,4	78,2 – 965,23	187,13	555,39	54 – 390
Pb	0,29 – 29,09	1,10 – 27,41	8,21	16,55	< 20
Hg	0,04 – 3,51	0,15 – 2,16	0,33	1,29	< 5
Cd	< LD	< LD	ND	ND	< 3

ND= No detectable, < LD = menor al límite de detección de la técnica

➤ Castillo, E., (2010) Determinó la concentración de 7 elementos trazas: Cu, Cd, Zn, Se, Cr, Pb y Hg en muestras de cabello y orina de niños con trastorno autista cuyas edades se encontraban entre 3-16 años. Castillo encontró las concentraciones de Cd y Hg se encontraron por debajo del intervalo de referencia para ambas muestras. En

orina, la concentración de Zn se mantuvo dentro del rango y los niveles de Cu y Pb se encontraron por encima de los valores de referencia. En cabello, el Pb estuvo por encima de los valores de referencia y el Zn y Cu por debajo de los mismos. Los resultados en cabello tanto de Zn como los de Cu (elementos esenciales) se encuentran por debajo de los valores de referencia, esto puede indicar que el aporte de nutrientes esenciales de la alimentación de los niños venezolanos, no está satisfaciendo los requerimientos necesarios. ^[24] En la tabla 5 están contenidos los resultados de la investigación de Castillo para las muestras de orina y cabello.

Tabla 5. Concentraciones en muestras de cabello y orina. Castillo, E.

Elemento	Intervalo de Concentración Grupo Autista	Mediana Grupo Autista	Intervalo de Concentración Grupo Control	Mediana Grupo Control	Intervalo de Concentración de Referencia
Concentraciones en muestras de cabello (µg/g)					
Zn	31,98 – 426,18	103, 19	61,31 – 426,81	119,19	140 – 220
Cu	1,53 – 30,40	7,92	3,35 – 33,46	4,83	11 – 37
Se	0,21 – 22,49	3,03	16,80 – 24,63	20,04	0,55 - 1,1
Cr	0,42 – 1,66	0,65	1,18 – 2,12	1,63	0,40 – 0,65
Pb	0,019 – 7,343	2,64	0,25 – 3,28	1,58	< 0,60
Hg	0,055 – 2,642	0,56	0,37 – 4,24	0,59	< 0,80
Cd	< LD	ND	< LD	ND	< 0,050
Concentraciones en muestras de orina (µg/24h)					
Zn	21,43 – 504,49	168,77	68,88 – 362,26	158,15	120-1300
Cu	24,18 – 518,17	185,34	22,07 – 229,70	82,33	11 – 68
Se	30,24 – 528, 17	237,13	131,91 – 3545	872,16	54 – 390
Cr	0,456 – 4,089	2,47	17, 83 – 63,51	37,98	20 – 114
Pb	8,852 – 188,53	77,56	9,70 – 105,92	39,81	< 20
Cd	< LD	ND	< LD	ND	< 5
Hg	0,066 – 8,630	0,48	0,35 – 8,23	2,86	< 3

ND= No detectable, < LD = menor al límite de detección de la técnica

➤ Montilla, L., (2011). Evaluó la concentración de Zn, Cu, Ca, Mg, Pb y Hg en muestras de cabello y suero sanguíneo de un grupo de niños autistas, encontrando

que para las muestras de cabello, las concentraciones de Zn y Cu se encuentran por debajo de los valores de referencia; mientras que en las muestras de suero sanguíneo la concentración de Zn se encontró por encima de los valores de referencia y la de Cu por debajo de los mismo. Finalmente, los elementos no esenciales como Pb y Hg se consideraron dentro de los valores de referencia es decir no se encontró alguna correlación de estos elementos con el autismo. ^[17] En la tabla 6 pueden observarse los resultados para las muestras de cabello y suero sanguíneo.

Tabla 6. Concentraciones en muestras de cabello y orina. Castillo, E.

Elemento	Mediana (µg/g)	Promedio (µg/g)	Desviación (µg/g)	Coefficiente de Varianza (%)	Intervalo de Concentración de Referencia (µg/g)
Cabello					
Ca	309	303	117	39	110 – 510
Mg	22	30	25	84	15 – 56
Cu	4	15	33	223	11 – 37
Zn	84	100	62	62	140 – 220
Pb	2	32	48	149	< 0,6
Hg	0,06	0,08	0,09	115	< 0,8
Suero Sanguíneo					
Ca	59,0	59,3	6,5	11,1	14 – 68
Mg	10	10	1	13	9 – 27
Cu	0,4	0,4	0,1	25,1	0,87 – 1,49
Zn	1,50	1,66	0,89	53,36	0,83
Pb	0,13	0,13	0,04	31,44	< 0,4
Hg	< LD	< LD	< LD	< LD	< 0,6

LD = Límite de detección de la técnica

4. JUSTIFICACION

Como se desprende de la revisión bibliográfica discutida anteriormente, en los últimos años ha habido un incremento en el número de estudios acerca del autismo, esto es debido en parte al aumento significativo de las tasas de individuos afectados y que las causas que lo originan siguen siendo desconocidas, sin embargo se asocian a factores genéticos, desordenes gastrointestinales, un sistema inmune-deficiente y/o contaminaciones ambientales. Una gran parte de estos estudios buscan determinar la posible influencia de los elementos potencialmente tóxicos y esenciales en el desarrollo del autismo ya que se ha comprobado que los desniveles de algunos elementos causan problemas significativos sobre la salud.

En Venezuela son poco los estudios que se realizan a muestras biológicas de personas con autismo. Debido a lo mencionado surge la necesidad de continuar con los estudios del Centro de Química Analítica sobre el contenido de elementos esenciales y no esenciales en muestras biológicas de niños autistas habitantes de la Gran Caracas.

Las investigaciones realizadas anteriormente por el Centro de Química Analítica, desglosadas en los antecedentes de este trabajo, muestran que no se ha encontrado niveles significativos en la presencia de elementos potencialmente tóxicos en ninguno de los tipos de muestras biológicas analizadas (orina, cabello y suero sanguíneo). Sin embargo, se han podido encontrar evidencias de que los niveles de elementos esenciales pueden tener un efecto sobre la severidad del autismo.

El presente trabajo busca determinar el contenido de los elementos esenciales: Zn, Fe, Cu, Mg y Ca en muestras biológicas de niños autistas, y de esta forma estudiar la posible correlación de estos elementos con el autismo y establecer si los suplementos vitamínicos permiten mantener los niveles apropiados de estos elementos y si no representan un riesgo para esta población.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Determinar la cantidad de los elementos esenciales Zn, Fe, Cu, Mg y Ca en muestras biológicas de niños con trastorno del espectro autista empleando espectrometría de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado (ICP-OES).

5.2 Objetivos Específicos

- Determinar los niveles de Zn, Fe, Cu, Mg y Ca en cabello y suero sanguíneo de niños con trastornos del espectro autista bajo control de dietas y suplementos vitamínicos.
- Determinar los posibles excesos o deficiencias de dichos elementos comparando el contenido de los mismos en los niños con TEA con los valores de referencia tomados de un grupo de niños control.
- Evaluar la relación Zn/Cu así como los niveles de Fe y estudiar si existe alguna relación con el estrés oxidativo.
- Estudiar la existencia de posibles relaciones entre la concentración de elementos en niños con TEA con factores como el consumo de suplementos vitamínicos de manera de evaluar si la dosis ingerida es adecuada o se trata de una sobredosis.

6. DESCRIPCION DE LA POBLACION

Para llevar a cabo esta investigación se requerían muestras de suero sanguíneo y de cabello, tanto de niños autistas como de niños control. Con el objetivo de encontrar población dispuesta a participar en el proyecto, se acudió a las instalaciones de la Sociedad Venezolana de Niños y Adultos Autistas (SOVENIA), donde se realizó una presentación formal del proyecto y se entregó material informativo acerca del mismo despertando interés en los padres y representantes de distintos niños. Consiguiéndose de esta manera la población que participó en esta investigación, la cual se dividió en los grupos:

➤ **Grupo I:** Formado por 24 niños con autismo (leve, moderado o severo). Todos los participantes de este grupo están diagnosticados por SOVENIA y/o por médicos y psicólogos de otras instituciones, además, están bajo control de dieta e ingesta de suplementos vitamínicos. Es importante destacar que para evitar interferencias en las medidas de los analitos, estos niños no habían ingerido suplementos vitamínicos antes de la toma de muestra sanguínea.

➤ **Grupo II:** Formado por 18 niños control, los cuales no están sometidos bajo ningún tipo de dieta ni tampoco a ingesta de suplementos vitamínicos.

Los integrantes de ambos grupos contaban con edades comprendidas entre 2-14 años, se encontraban en ayuna antes de la toma de muestra sanguínea y participaron en el estudio con el previo consentimiento y autorización de sus representantes.

7. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

7.1 Obtención y almacenamiento de las muestras de cabello y suero sanguíneo

Se realizó una jornada de recolección de muestras en las instalaciones de SOVENIA a la que asistieron niños con autismo y niños control de distintas edades.

Para la obtención de las muestras de cabello, se cortó una porción de aproximadamente 0,5 g de la región occipital de la cabeza del niño, lo más cercano que se pudo al cuero cabelludo, las mismas se depositaron dentro de bolsas plásticas con cierre hermético previamente identificadas y se guardaron en un lugar libre de calor y de humedad, manteniéndose allí hasta el momento de realizar la digestión.

Por otra parte, con la ayuda de una licenciada en Bioanálisis y un especialista en toma de muestras infantiles, se tomaron muestras de aproximadamente 5 mL de sangre, las cuales se sometieron a centrifugación durante 10 min, obteniéndose aproximadamente 2 mL de suero sanguíneo por cada muestra, estas fueron trasvasadas a viales plásticos previamente lavados y rotulados, finalmente se congelaron a -6°C manteniéndose de esta manera hasta el momento de la digestión.

7.2 Soluciones y reactivos utilizados

Para el tratamiento de las muestras de cabello y suero sanguíneo, se empleó HNO_3 al 65% p/p tridistilado en un destilador de teflón por debajo del punto de ebullición y H_2O_2 al 30% p/p, ambos de la casa Riedel deHaën. Además, para los lavados de las muestras de cabello se utilizó sal di-sódica de EDTA (triplex III) al 99% de pureza de la marca Merck. Para la dilución de ambas muestras se empleó agua destilada y para la medición por ICP-OES se utilizó gas Argón USP proveniente de Linde Venezuela.

La tabla 7 presenta las concentraciones de los patrones multielementales, utilizados para la elaboración de las curvas de calibración, se prepararon a partir de estándares de 1000 mg/L de concentración de Ca, Mg, Fe, Cu, Zn, Cr, Al y Pb de la marca Fluka Chemika, los cuales fueron acidificados al 2% de HNO_3

Tabla 7. Concentración de los patrones empleados en la curva de calibración.

Patrón	Ca [mg/L]	Mg [mg/L]	Fe [mg/L]	Cu [mg/L]	Zn [mg/L]	Cr [mg/L]	Al [mg/L]	Pb [mg/L]
Suero Sanguíneo								
1	1	0,5	0,05	0,05	0,05	0,5	0,5	0,5
2	2	0,8	0,1	0,08	0,1	1	1	1
3	4	1,5	0,5	0,15	0,5	1,5	1,5	1,5
4	6	3	1	0,3	1	2	2	2
Cabello								
1	3	0,3	0,15	0,2	1,5	0,03	0,05	0,03
2	6	0,6	0,3	0,4	3	0,04	0,1	0,04
3	9	0,9	0,45	0,6	4,5	0,05	0,15	0,05
4	12	1,2	0,6	0,8	6	0,06	0,2	0,06

Es importante mencionar que todo el material volumétrico utilizado se lavó con solución de HNO_3 al 2% y agua bidestilada.

7.3 Tratamiento de muestras

El tratamiento de las muestras se realizó mediante la metodología optimizada por Montilla.^[17]

7.3.1 Tratamiento de las muestras de suero sanguíneo

Se pesaron aproximadamente 0,5000 g de suero sanguíneo en recipientes plásticos previamente lavados y rotulados, se añadió 1 mL de HNO_3 al 65% y se sometió a ultrasonido durante 2 h a una temperatura aproximada de 60 °C, transcurrido este tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió gota a gota 300 μL de H_2O_2 al 30 % y se sometió nuevamente a 2 h de ultrasonido manteniendo la temperatura de 60°C. Se dejó reposar, finalmente se llevó a 10 mL empleando agua destilada y se determinó la concentración de los analitos por ICP-OES.

7.3.2 Tratamiento de las muestras de cabello

Se pesaron aproximadamente 0,2000g de cabello en tubos plásticos previamente lavados y rotulados, se añadió 14 mL de EDTA al 1% p/v, con el fin de eliminar los metales que pudieran estar presente por contaminación exógena, se taparon los tubos y se sometieron a ultrasonido durante 3 h con una temperatura de 45 °C aproximadamente, transcurrido el tiempo, se descartó el EDTA. Seguidamente se realizó un segundo lavado, esta vez utilizando 14 mL de agua destilada, sometiendo las muestras a 15 min de ultrasonido, conservando la temperatura de 45°C y descartando el agua culminado el tiempo, este procedimiento se realizó por triplicado. Luego de culminar con la serie de lavados, se procedió a la digestión del cabello, para ello se añadió 1,5 mL de HNO_3 y se sometió a ultrasonido por 5 h aproximadamente hasta observar la digestión total. Seguidamente se adicionó 1,2 mL de H_2O_2 al 30% se sometió nuevamente a ultrasonido durante 3 h, transcurrido el tiempo, se dejó enfriar a temperatura ambiente, se llevó a 10 g empleando agua destilada y se determinó la concentración de los analitos por ICP-OES.

7.4 Instrumentación

7.4.1 Espectrómetro de emisión óptica con plasma inductivamente acoplado

Para realizar el análisis elemental se utilizó un Espectrómetro de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado, ICP-OES, marca Thermo Jarrel Ash, modelo IRIS-HR el cual se muestra en la figura 8.



Figura 8. Espectrómetro de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado.

Este equipo está constituido por un generador de radiofrecuencia de 220 V que opera a una frecuencia de 27,12 MHz, un quemador del tipo desmontable de cuarzo con un inyector de 1,00 mm de diámetro, circundado por tres espiras de cobre de 4,00 mm de diámetro externo, refrigeradas con agua.

El sistema óptico consta de un monocromador de dispersión cruzada, provisto de una red de “Echelle”, de 62 líneas/mm con una distancia focal de 381 mm y un prisma para separar los distintos órdenes.

El detector es de estado sólido (fabricado de Si), donde la cantidad de fotones que llega a éste es proporcional a la corriente eléctrica generada. Específicamente, es un detector CID (Detector de Inyección a la Carga) el cual opera a bajas temperaturas (-70 °C) mediante la ayuda de gas argón que circula en una unidad refrigerante. Este arreglo hace posible el análisis simultáneo.

La tabla 8 presenta las condiciones de operación del equipo y las longitudes de onda de trabajo, las cuales fueron optimizadas en trabajos previamente realizados. [24, 29]

Tabla 8. Condiciones de operación del equipo ICP-OES y longitudes de onda de trabajo.

Parámetro	Valor
Potencia del Generador RF (W)	1350
Flujo de Gas Plasmógeno (L/min)	12
Flujo de Gas Nebulizador (L/min)	0,4
Aspiración de Muestra (mL/min)	1,14
Flujo de Gas Auxiliar (L/min)	1,5
λ_{trabajo} (nm)	Al (309,2); Ca (317,9); Cr (284,3); Cu (219,9); Fe (238,2 ; 259,9); Mg (280,2) Pb (220,3); Zn (202,5 ; 206,2)

7.4.2 Extracción asistida por energía de ultrasonido

La figura 9 muestra el equipo empleado para la extracción asistida con ultrasonido, modelo 8892, de la casa Cole Palmer, USA utilizado para agilizar el proceso de digestión de la muestra.



Figura 9. Baño de Ultrasonido.

Los sistemas de ultrasonidos estándar operan generalmente a 40 KHz, y son muy fáciles de utilizar. Los ultrasonidos originan vibraciones que proporcionan agitación de la muestra por generación de burbujas microscópicas que se contraen y expanden dando lugar a altas temperaturas y presiones locales, que producen agitación de la muestra y rotura de las partículas sólidas. Las muestras sometidas a energía ultrasonidos se dispersan de tal forma que se origina una fina suspensión que se ataca

fácilmente por los reactivos (ácidos o bases). Los metales son extraídos generalmente en ácidos diluidos. Esta técnica proporciona recuperaciones entre el 94 – 100 %, además de mayor eficiencia en la disolución de analitos de muestras con matrices complejas reduciendo los tiempos de tratamiento si se comparan con los métodos clásicos de agitación. ^[38]

7.5 Análisis estadísticos de datos

Los estadísticos descriptivos mediana, media aritmética y rango intercuartílico fueron utilizados para reportar los resultados obtenidos en esta investigación.

Se reportó la mediana de los datos debido a que no se conoce la distribución de los mismos y no puede definirse a priori una distribución normal. Sin embargo, el valor de la media, la cual describe un conjunto de datos con una distribución normal también se incluyó en la tabla de reporte a manera de comparación.

Se graficaron los datos originales en columnas con el fin de observar la tendencia de cada uno en los pacientes, además, se añadió el intervalo de referencia con lo que se puede apreciar fácilmente los niños que presentan exceso o deficiencia de elementos.

Se realizaron diagramas de caja y bigote con el objetivo de representar visualmente la mediana, rango intercuartílico, dispersión, simetría y presencia de valores atípicos en el conjunto de datos correspondiente a cada grupo en estudio, estos diagramas también fueron útiles para estudiar la relación Zn/Cu en las diferentes muestras (suero sanguíneo y cabello).

Finalmente se determinó la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos y para cada elemento comparando los valores de las medianas, basándose en el análisis de dos muestras independientes, para ello se

empleó la prueba no paramétrica: U de Mann-Whitney, la cual se construye combinando las dos muestras, ordenando todos los datos de menor a mayor, y comparando las jerarquías promedio de las dos muestras combinando los datos. Al obtenerse un valor de $p \geq 0,05$ puede decirse que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medianas. ^[51] Una información más detallada sobre cómo aplicar esta prueba se encuentra contenida en el apéndice 11.

Todo el análisis estadístico de los datos se realizó empleando el programa STATGRAPHICS Centurion XVI versión 16.1.15 para Windows (versión de prueba).

8. RESULTADOS Y DISCUSIONES

A continuación se presentan los resultados obtenidos en esta investigación, comenzando con el análisis de las muestras de suero sanguíneo, seguido por el análisis de las muestras de cabello y finalizando con el estudio de la relación Zn/Cu en ambas muestras y su intervención en el síndrome.

8.1 Distribución de la concentración de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de suero sanguíneo

En la tabla 9 se muestra la estadística descriptiva correspondiente a las muestras de suero sanguíneo tanto para el grupo de niños autistas como para el grupo de niños control. Los datos crudos y los límites de cuantificación se encuentran contenidos en los apéndices 4, 5 y 6 de este trabajo.

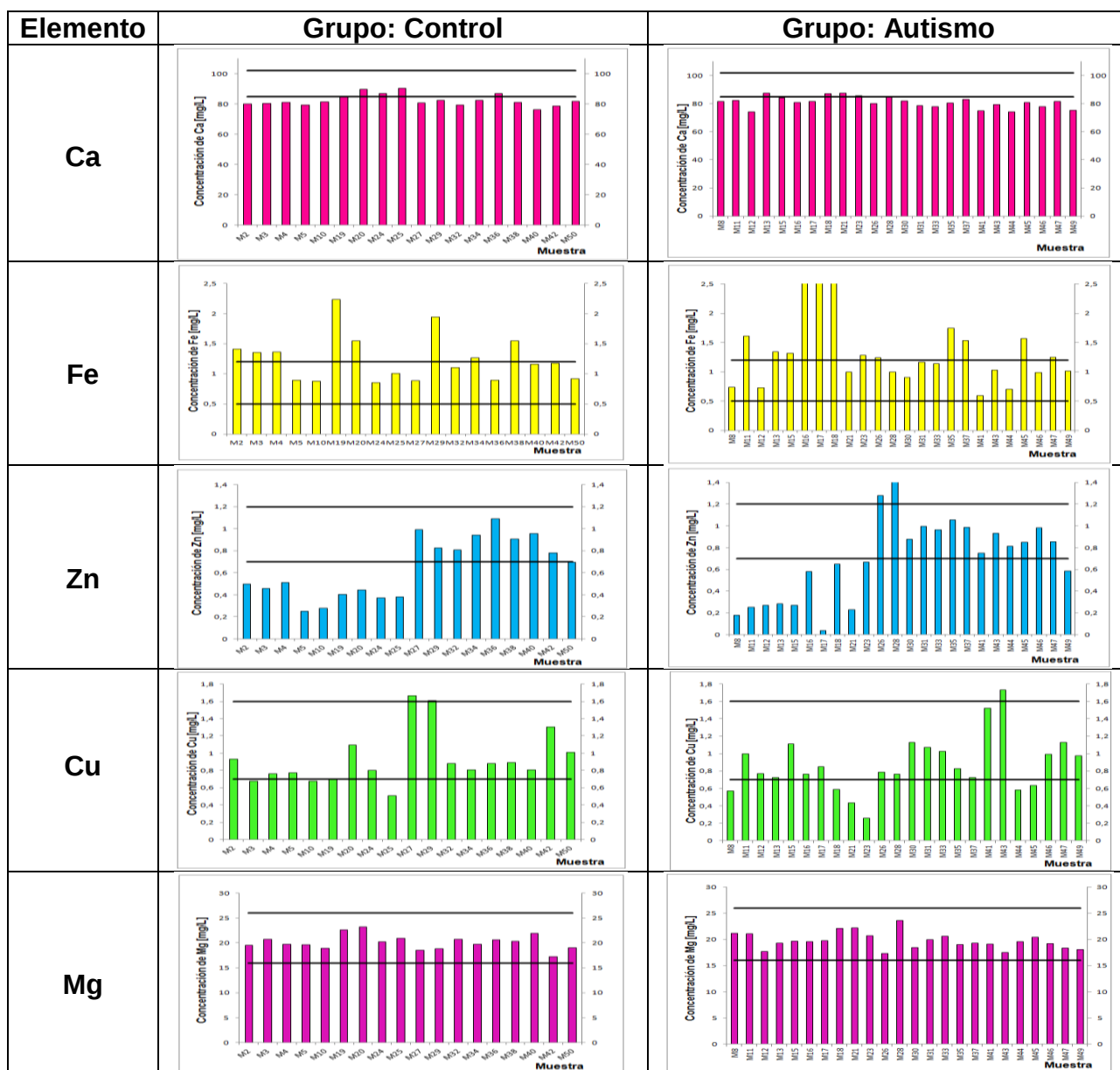
Tabla 9. Estadística descriptiva de las muestras de suero sanguíneo.

Elemento	Mediana [mg/L]	Rango Intercuartílico [mg/L]	Promedio [mg/L]	Intervalo de Referencia [mg/L]
Niños Autistas				
Ca	81,2	78,8 – 84,2	81,0	85 – 102
Fe	1,20	0,99 – 1,51	1,74	0,5 – 1,2
Zn	0,78	0,28 – 0,99	0,70	0,7 – 1,2
Cu	0,81	0,63 – 1,07	0,87	0,7 – 1,6
Mg	19,6	18,5 – 20,6	19,8	16 – 26
Niños Control				
Ca	81,2	80,3 – 84,8	82,4	85 – 102
Fe	1,17	0,87 – 1,41	1,25	0,5 – 1,2
Zn	0,60	0,40 – 0,91	0,64	0,7 – 1,2
Cu	0,84	0,76 – 1,01	0,93	0,7 – 1,6
Mg	20,0	19,1 – 20,7	20,2	16 – 26

Tomando en cuenta el valor de la mediana obtenido para cada elemento, puede notarse que para el grupo de niños autistas los niveles de Fe, Zn, Cu y Mg se ubican dentro del intervalo de referencia, a diferencia del Ca que un valor de 81,2 mg/L se ubica por debajo de dicho intervalo. Por su parte, el grupo de niños control presentó valores dentro del intervalo de referencia para los elementos Fe, Cu y Mg, y los elementos Ca y Zn se ubicaron por debajo del rango con valores de 81,2 mg/L y 0,60 mg/L respectivamente. Las concentraciones de los elementos varían poco entre los dos grupos, a excepción del Ca que presentó el mismo valor de la mediana para ambos grupos. Con el objetivo de establecer si existen diferencias estadísticas o no entre los dos grupos se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney con $\alpha = 0,05$. Los valores de p fueron 0,438; 0,869; 0,675; 0,638 y 0,401 para el Ca, Fe, Zn, Cu y Mg respectivamente. Al ser $p \geq 0,05$ (nivel de significancia) indica que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los grupos para ninguno de los elementos analizados.

Estas observaciones conducen a pesar que las concentraciones de los elementos en estudio es similar entre ambos grupos, estos resultados están directamente asociados a la acumulación elemental reciente, por lo tanto pueden ser relacionados con la dieta diaria, lo que indica que a pesar de que los niños autistas están sometidos a una dieta estricta, la ingesta diaria del suplemento vitamínico ayuda a normalizar los niveles de elementos esenciales en el cuerpo, al menos en comparación con el grupo control. Tampoco hay evidencia de un exceso de suplemento vitamínico.

La figura 10 presenta los datos crudos en forma de columnas a manera de visualizar el contenido elemental de cada paciente, y compararlos con el intervalo de referencia (indicado en la gráfica mediante dos líneas horizontales de color negro).



- Unidades = mg/L
- Los valores de referencia para cada elemento son representados con una línea horizontal de color negro.

Figura 10. Distribución de las concentraciones de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de suero sanguíneo.

El estudio de estos gráficos facilita el entendimiento de los valores reportados en la tabla 10. Tomando como el 100% la cantidad total de muestras en cada grupo, se

observa claramente que aproximadamente entre un 50% y 70% de la población total de cada grupo presenta valores por debajo del intervalo de referencia para el Ca y el Zn. Para el resto de los elementos (Fe, Cu y Mg) la mayoría de los pacientes cuenta con concentraciones que se mantienen dentro de los rangos considerados como referencia.

El Zn se mantiene en equilibrio con el Cu en la sangre de acuerdo a diversos estudios y los niveles sanguíneos de estos suelen estar inversamente relacionados, por lo que la deficiencia de Zn se asocia generalmente con el exceso de Cu ^[49]. Sin embargo, en los gráficos se observa que en los pacientes que presentan deficiencias de Zn poseen valores de Cu casi constantes, ubicándose dentro del intervalo de referencia. A pesar de esto, en la sección 8.3 se estudia la relación Zn/Cu ya que es el parámetro que está relacionado con la presencia de estrés oxidativo en el organismo. Curiosamente, se observa que en el grupo de niños autistas la mayoría de los pacientes que presentan deficiencia en los niveles de Zn cuentan con niveles elevados de Fe y aunque no se encontró información que relacionara estos dos elementos, se conoce que niveles elevados de Fe séricos contribuyen con la aparición de estrés oxidativo, por lo que en la sección 8.3 también se evaluó la relación Fe/Zn.

Una representación apropiada de la descriptiva para apreciar la dispersión y asimetría del conjunto de datos, es mediante la construcción de diagramas de caja y bigote, además los mismos muestras los estadísticos como la mediana y el rango intercuartílico utilizados para expresar los resultados de este trabajo. En la figura 11 están contenidos los diagramas de caja y bigote correspondientes a las muestras de suero sanguíneo de los dos grupos en estudio.

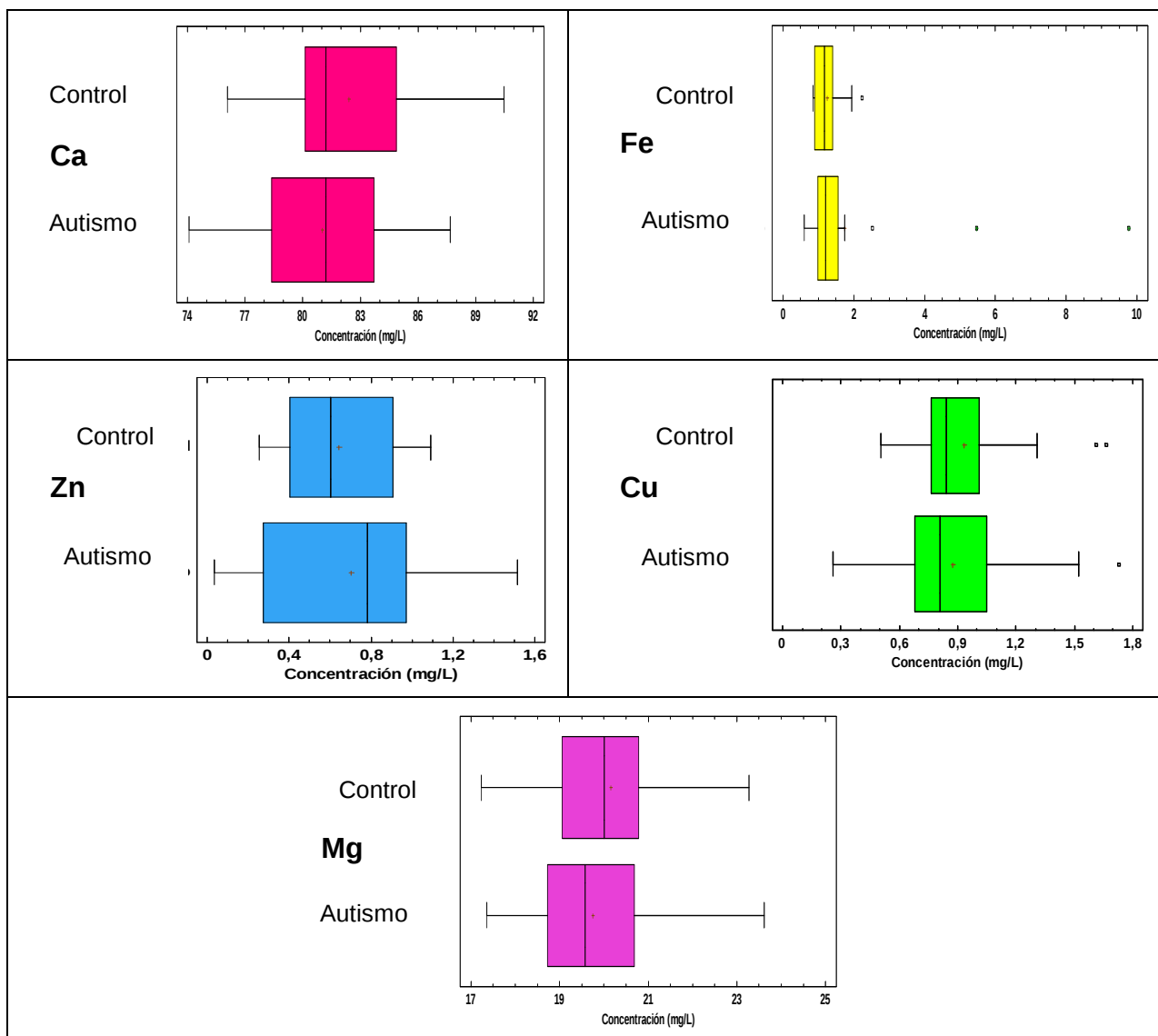


Figura 11. Diagrama de caja y bigote de las concentraciones de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de suero sanguíneo.

En los diagramas de caja y bigote, el rectángulo o caja delimita el rango intercuartílico (representa el 50% de la población) con la arista izquierda ubicada en el primer cuartil (valor mayor que el 25% de la población) y la arista derecha ubicada en el tercer cuartil (valor que sobrepasa el 75% de los valores de la distribución). La línea vertical que

pasa a través del rectángulo corresponde al segundo cuartil y representa la mediana. De las aristas del rectángulo se extiende una línea, o bigote, que va hacia los valores extremos (valor mínimo y valor máximo). Estas son observaciones que se encuentran entre cero y 1.5 veces el rango intercuartílico a partir de las aristas del rectángulo. Las observaciones que están entre 1.5 y 3 veces el rango intercuartílico a partir de las aristas del rectángulo reciben el nombre de valores atípicos y pueden ser representadas mediante puntos, cruces o asteriscos; finalmente el punto o cruz ubicado dentro de la caja representa la media del conjunto de datos. ^[52] Dicho esto, se puede notar que en general el grupo de niños autistas presentan una mayor dispersión de las concentraciones en comparación con el grupo de niños control. Para el Ca, la mediana coincide en ambos grupos, sin embargo, el grupo de niños control presenta una mayor dispersión hacia la derecha mientras que el grupo de niños autistas cuenta con una distribución cercana a la normalidad, ya que la media y la mediana coinciden. Para el Fe, la distribución es parecida en ambos grupos, el grupo de niños autista presenta una asimetría hacia la derecha la cual está influenciada por la presencia de 3 valores atípicos, los cuales sobrepasan la escala del eje en el gráfico de columnas. Para el Zn, los niños autistas cuentan con una mayor dispersión dirigida hacia los valores más bajos de concentración, mientras que con el grupo de niños control ocurre lo contrario. En ambos grupos, el Cu presentan asimetría por la derecha influenciada por la presencia de valores atípicos. La distribución en el Mg se asemeja entre ambos grupos, acercándose a la normalidad. Mientras más cercanos sea los valores de la media y la mediana más próxima a la normalidad será la distribución de los datos.

Como se dijo anteriormente, estos resultados pueden vincularse directamente a la dieta diaria, y la mayor dispersión observada en el grupo de niños autistas puede deberse las distintas dosis de suplemento vitamínico consumidas por cada niño.

Es de vital importancia tomar en cuenta los valores bajos de Zn observados en ambos grupos estudiados, ya que este elemento contribuye con el normal desarrollo durante el embarazo, la infancia y la adolescencia. Además que la deficiencia de Zn no

se asocia solo con factores nutricionales sino con varios estados de enfermedades incluyendo síndrome de malabsorción.^[49]

Para Li, S. (2014) la deficiencia de Zn en suero contribuye al mal funcionamiento del sistema neurotransmisor, disminución de la actividad enzimática gastrointestinal y aumento del estrés oxidativo.^[48] Por otro lado, Russo, A. (2011) asocia la deficiencia de Zn con el mal funcionamiento del ácido γ -aminobutírico “GABA” (aminoácido que cumple con funciones de neurotransmisor) y con la reducción en la inducción de la síntesis intestinal de la proteína metalotioneína.^[20]

8.2 Distribución de la concentración de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de cabello

Se analizaron muestras de cabello de manera de obtener información acerca de la acumulación metálica en el organismo. Algunas de estas muestras fueron descartadas debido a la poca cantidad de las mismas resultando insuficiente para el análisis. Se analizaron 13 muestras correspondientes al grupo de niños control y 16 muestras correspondientes al grupo de niños autistas. La tabla 10 presenta la estadística descriptiva de las muestras de cabello tanto para el grupo de niños autistas como para el grupo de niños control. Los datos crudos y los límites de cuantificación están contenidos en los apéndices 4,7 y 8 de este trabajo.

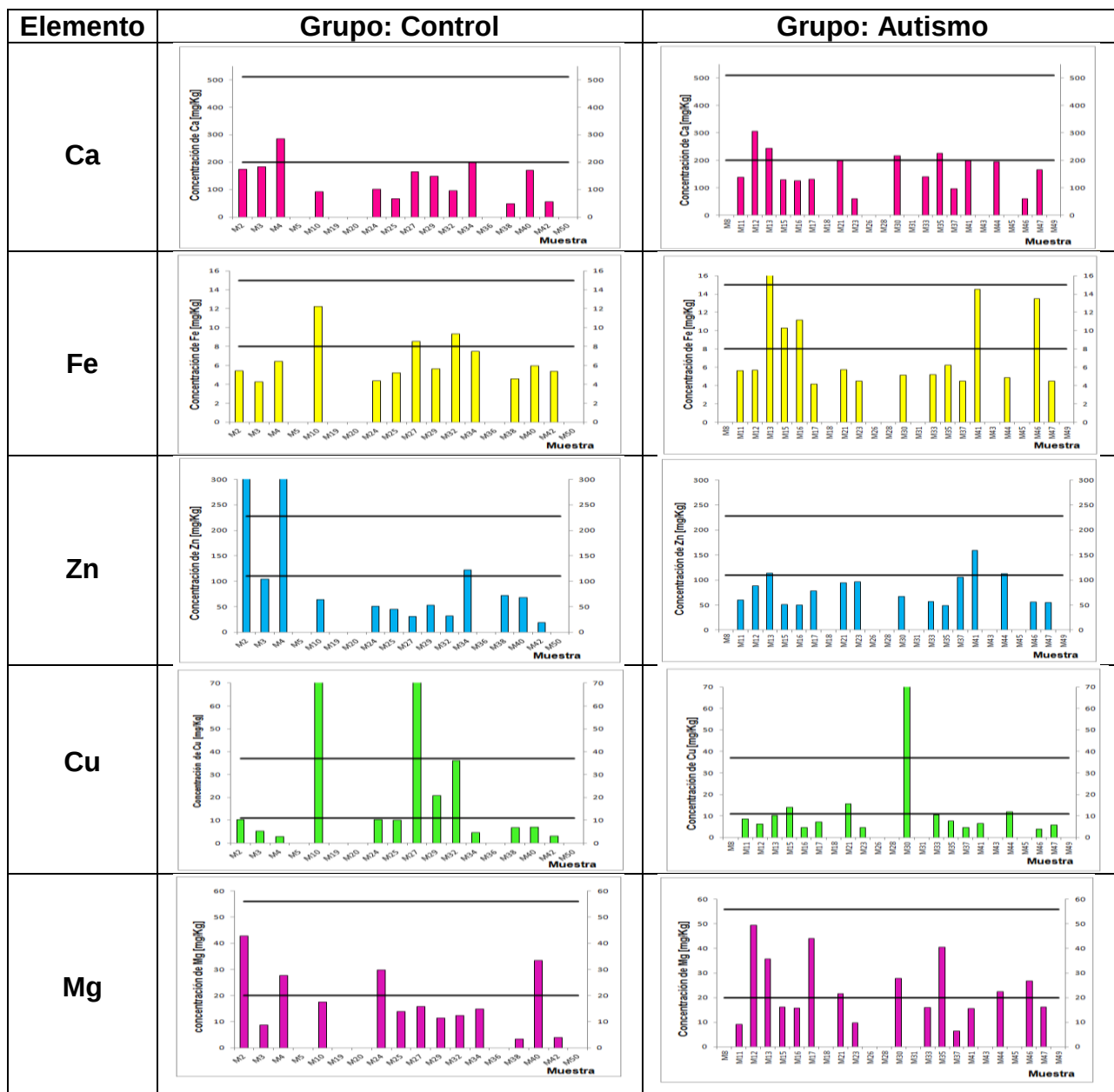
Tabla 10. Estadística descriptiva de las muestras de cabello.

Elemento	Mediana [mg/Kg]	Rango Intercuartílico [mg/Kg]	Promedio [mg/Kg]	Intervalo de Referencia [mg/Kg]
Niños Autistas				
Ca	153	130 – 216	165	110 -510
Fe	5,66	4,50 -11,15	7,81	8 -15
Zn	73	59 – 97	81	110 – 228
Cu	7	5 – 11	18	8 – 37
Mg	19	16 – 32	23	15 – 56
Niños Control				
Ca	149	100 – 170	137	110 -510
Fe	5,64	5,36 – 7,49	6,53	8 -15
Zn	64	44 – 104	115	110 – 228
Cu	10	5 – 21	22	8 – 37
Mg	15	12 – 28	18	15 – 56

El grupo de niños autista presenta concentraciones por debajo del intervalo de referencia para los elementos Fe, Zn y Cu, los cuales cuentan con una mediana de 5,66 mg/Kg; 73 mg/Kg y 7 mg/Kg respectivamente. Por su parte, el grupo de niños control posee concentraciones de Fe y Zn por debajo del intervalo de referencia con un valor de mediana de 5,64 mg/Kg y 64 mg/Kg respectivamente. El resto de los elementos presentaron valores de concentración que se ubican dentro del intervalo de referencia para ambos grupos.

Al igual que en las muestras de suero sanguíneo, se compararon los valores de las medianas empleando la prueba U de Mann-Whitney, $\alpha = 0,05$ y así establecer si existen o no diferencias estadísticamente significativa entre ambos grupo. Los valores p fueron 0,245; 0,947; 0,469; 0,701 y 0,211 para el Ca, Fe, Zn, Cu y Mg respectivamente y con valores de $p \geq 0,05$ se acepta la hipótesis nula ($\text{mediana}_{\text{control}} = \text{mediana}_{\text{autismo}}$) por lo tanto, se puede decir que no existen diferencia estadísticamente significativas entre los dos grupos para ninguno de los elementos analizados.

De manera de obtener una representación más visual sobre la carga elemental en cada paciente, los datos crudos fueron graficados en forma de columna, se añadió al igual que los gráficos elaborados para las muestras de suero sanguíneo dos líneas horizontales de color negro, las cuales representan el intervalo de referencia, de esta manera y tomando como 100% el número de muestras totales tanto en el grupos de autistas como en el grupo de niños control se puede estimar qué porcentaje de la población presenta exceso o deficiencia en la carga elemental. La figura 12 muestra los gráficos de columna para cada uno de los elementos de los dos grupos de niños en estudio.



- Unidades = mg/Kg
- Los valores de referencia para cada elemento son representado con una línea horizontal de color negro.

Figura 12. Distribución de las concentraciones de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de cabello.

De manera general, se observa que más del 70% de las muestras de ambos grupos cuentan con concentraciones ubicadas por debajo del intervalo de referencia a excepción del magnesio en el grupo de niños autistas que solo el 50% de las muestras se encuentran por debajo del rango.

Los pacientes que presentaron valores elevados de Fe en suero sanguíneo tienen valores bajos de este elemento en cabello. Al no observarse acumulación de Fe, es lógico pensar que el exceso del mismo proveniente de una exposición reciente está reaccionando diariamente en el organismo, generando radicales libres y contribuyendo de esta manera a la aparición de estrés oxidativo.

Los niveles bajos de Zn se vuelven a observar en estas muestras, y a excepción de 3 pacientes de la población total, no se observó que la deficiencia de Zn correspondiera con incrementos de Cu.

La figura 13 presenta los diagramas de caja y bigote que permiten visualizar la descriptiva de los grupos estudiados. Se puede apreciar que ambos son similares en su contenido elemental promedio.

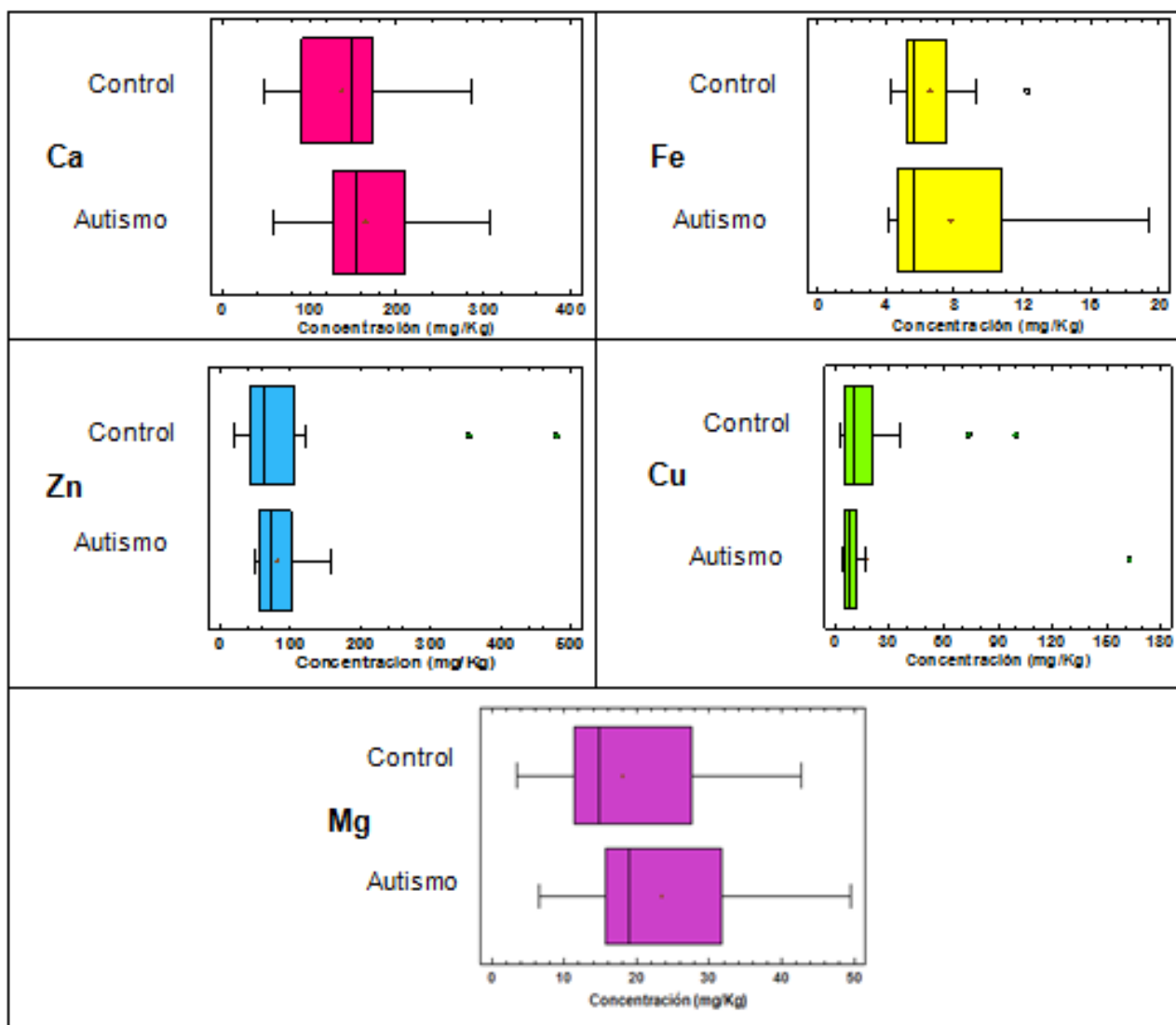


Figura 13. Diagrama de caja y bigote para las concentraciones de Ca, Fe, Zn, Cu y Mg en muestras de cabello.

El grupo de niños autistas presenta una mayor dispersión para los elementos Ca, Fe y Mg. Por su parte, los elementos Cu y Zn se presentan más dispersos en el grupo de niños control. Al igual que en las muestras de suero sanguíneo, el Ca presentó valores de mediana similares en ambos grupos, pero el grupo de niños autistas presenta mayor

dispersión dirigida hacia los valores más altos de concentración, a diferencia del grupo control el cual la mayor dispersión la presenta dirigida hacia los valores más bajos de concentración. Para el grupo de niño control, los elementos Fe, Zn y Cu presentan una dispersión dirigida hacia la derecha debido a la influencia de valores atípicos, estos valores corresponden a pacientes cuya concentración sobrepasa los intervalos de referencia y puede observarse en los gráficos de columnas. Un paciente para el caso de Fe y dos para el caso de Zn y Cu. Estos elementos (Fe, Zn y Cu) presentaron distribuciones dirigidas hacia la derecha en el grupo de niños autistas, influenciada por la presencia de un valor atípico solamente en el caso del Cu. Por su parte, el Mg presentó una distribución bastante similar en ambos grupos. A diferencia de las muestras de suero sanguíneo, en el cabello la media y la mediana se encuentran más alejadas para todos los elementos, por lo que la distribución de estos en las muestras de cabello pueden estar bien alejadas una distribución normal.

El cabello nutrido al crecer por los elementos que son transportados por la sangre, es por ello que el análisis de este espécimen proporciona información acerca de la carga metálica en el organismo. Los valores obtenidos en el grupo de niños autistas podrían indicar que la dosis de suplemento vitamínico no es suficiente para alcanzar los requerimientos necesarios o es posible que se trate de un problema de absorción que presentan estos niños. Sin embargo, el comportamiento de ambos grupos fue bastante similar, sin diferencias estadísticamente significativas, lo que podría relacionarse con el estado nutricional de los niños habitantes de la Gran Caracas. Por último, es posible que los valores utilizados como intervalos de referencia no sean válidos para la población venezolana y por ello no se ajusten a los valores obtenidos, debido a que estos fueron tomados de laboratorios localizados en el extranjero y la exposición a metales varía según la región, Además, no se está seguro de que estos laboratorios hayan tomados en cuenta la posibilidad de que las muestras contaran con contaminación exógena, generando así valores por encima de lo normal. Al no

observarse valores elevados en la carga de Fe, es posible que el exceso de este elemento en el suero sanguíneo contribuya con la aparición del estrés oxidativo.

Los niveles bajos de Zn coinciden con el estudio de Russo y DeVito (2011) quienes sugieren que estos resultados pueden ocasionar daño en el ADN, lo que puede deberse a una combinación de estrés oxidativo y el deterioro de las defensas antioxidantes.^[20]

Por otro lado, Blaurock-Busch, E. (2012), asocia la deficiencia de Zn con una exposición a metales tóxicos en combinación de un estado nutricional inadecuado.^[19]

Yasuda, H. (2013) relaciona los niveles bajos de Zn en niños con que estos requieren mayores cantidades de Zn (por Kg de peso corporal) durante su desarrollo y crecimiento.^[1]

Bjørklund, G. (2013) relaciona la deficiencia de Zn no solo con factores nutricionales sino que también con los cambios en la flora y función intestinal que son comunes en pacientes con autismo, considera que una malabsorción debido a los cambios patológicos en la mucosa intestinal es una de las causas de esta deficiencia.^[49]

Todos estos investigadores han encontrado también elevados niveles de Cu, lo que han relacionado directamente con la deficiencia de Zn y la presencia de estrés oxidativo en el organismo. Además reportan acumulación de metales pesados como el Pb y el Hg, concluyendo que la presencia de estos podría interferir en la absorción de elementos esenciales como el Zn.

Debido a que numerosos estudios relacionan la deficiencia de elementos esenciales con la acumulación de elementos potencialmente tóxicos, se analizó los metales Al, Cr y Pb en todas las muestras que conforman la población en estudio, (los resultados se incluyen en los apéndices 4-7 de este trabajo) a excepción de algunos pacientes, no se detectó la presencia de estos elementos, estas observaciones son sustentadas por las investigaciones previas realizadas en el Centro de Química Analítica y desglosadas en los antecedentes de este trabajo, donde no se observa

presencia de elementos potencialmente tóxicos al menos en los niños habitantes de la Gran Caracas.

8.3 Estudio comparativo de la relación Zn/Cu en suero sanguíneo y cabello de niños autistas y niños control

En los últimos años se han hechos esfuerzos para establecer la normalidad de valores de concentración metálica en distintos especímenes de origen humano incluyendo el suero sanguíneo, esto con el objetivo de determinar los rangos de concentración que mejor soporten la actividad enzimática y brinden un mejor estado de salud. El Zn y el Cu tienen efectos antagónicos entre sí. El Zn mantiene un equilibrio con el Cu en la sangre, y los niveles sanguíneos de estos dos suelen estar inversamente relacionados, siendo 1:1 la relación normal de Zn/Cu en niños y adultos. Un nivel bajo de Zn siempre está asociado con un nivel de Cu elevado. La relación Zn/Cu se ha aplicado como un método rápido para determinar el estado funcional del sistema de metalotioneínas. Bajas relaciones Zn/Cu pueden reflejar deficiencia de Zn en el cuerpo y disminución de la eficiencia en la eliminación de elementos potencialmente tóxicos de los tejidos y la sangre a través del sistema de metalotioneínas, ya que una de las principales funciones de estas enzimas es eliminar iones metálicos principalmente para mantener la homeostasis de Zn y Cu. ^[50]

La relación Zn/Cu ha sido de gran utilidad en los últimos años, ya que esta relación en suero sanguíneo permite correlacionar los niveles de la enzima Superoxido Dimutasa (SOD) tanto en niños autistas como en niños control, es decir, es un biomarcador de la enzima. Niveles de Superoxido Dimutasa bajos se asocian a diversas enfermedades crónicas como inflamación del colón, intestino delgado y/o estómago, ya que esta enzima cataliza la dismutación de superóxido en oxígeno y peróxido de

hidrógeno. Debido a esto, es importante la defensa antioxidante en la mayoría de las células expuestas al oxígeno. ^[17]

A pesar que no hay nada reportado sobre la relación de Zn/Cu en las muestras de cabello, igual se analizó en este estudio y se comparó con las investigaciones anteriores realizadas en el Centro de Química Analítica.

En la figura 14 se muestra la relación Zn/Cu en muestras de cabello y suero sanguíneo correspondiente a los grupos en estudio.

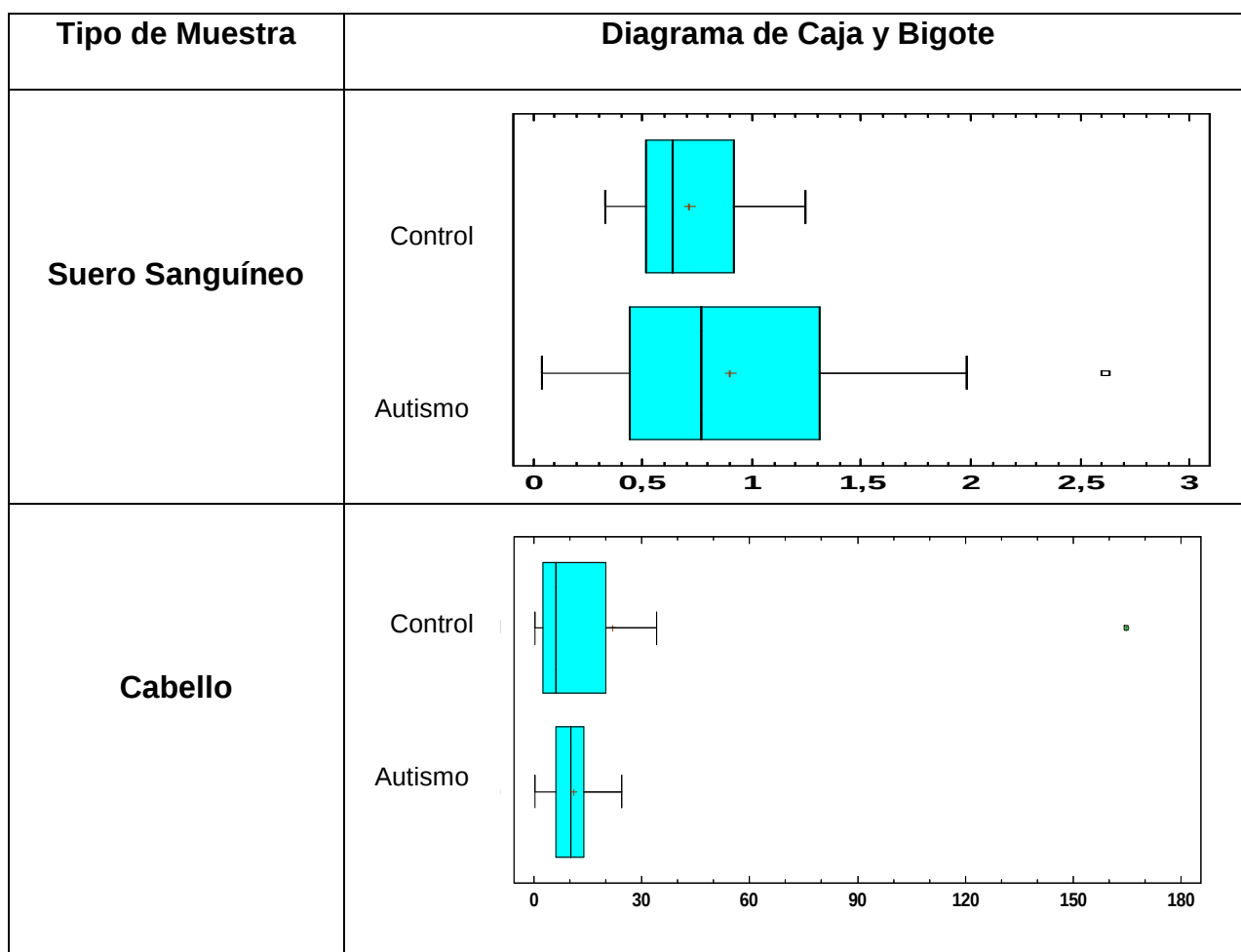


Figura 14. Relación Zn/Cu para muestras de cabello y suero sanguíneo en niños con autismo y niños control.

Al observar valores de mediana cercanos entre ambos grupos, se realizó comparaciones aplicando la prueba U de Mann-Whitney, $\alpha = 0,05$. Se obtuvieron valores p de 0,423 para el suero sanguíneo y de 0,497 para el cabello por lo que se concluye que no existe diferencia estadísticamente significativa entre los grupos para ninguno de los dos tipos de muestras.

La tabla 11 presenta valores de la relación Zn/Cu en ambos tipos de muestras proveniente de estudios nacionales e internacionales.

Tabla 11. Relación Zn/Cu provenientes de distintos estudios en muestras de cabello y suero sanguíneo.

Autor	Tipo de Muestra	Zn/Cu Niños	Zn/Cu Niños
		Autistas	Control
Emil Castillo*	Cabello	13,03	24,67
Mercedes Rosales*	Cabello	21,14	22,77
Si-ou Li (China)	Suero Sanguíneo	0,608	0,727
A.J. Russo (USA)	Suero Sanguíneo	0,703	0,933

*Estudios realizados en Venezuela

Para las muestras de cabello, puede observarse que la relación Zn/Cu se aleja de lo que se ha obtenido por otros estudios realizados en Venezuela, y debido a que no hay información reportada acerca esta relación elemental en muestras de cabello, no puede afirmarse que este resulte útil para evaluar la misma. Sin embargo, proporciona información sobre la carga metálica presente en el organismo.

Por otro lado, la relación Zn/Cu en las muestras de suero sanguíneo es cercana a la observada internacionalmente por otros experimentadores, a diferencia que en esos estudios el grupo de niños autistas presenta menor relación que el grupo de niños control, y en este estudio se observa un resultado contrario. A pesar de esto, no se considera que se presenten valores anómalos en ninguno de los dos grupos. La

deficiencia de Zn no puede relacionarse con el Cu, pues no se presentan valores elevados de este elemento, por lo que no puede indicarse la presencia de estrés oxidativo por causa del Cu. Sin embargo, la alta concentración de Fe presente en el 50% de la población autista podría contribuir a la aparición de estrés oxidativo en estos niños ya que, el Fe sufre una rápida oxidación al pasar de Fe^{+2} (ión ferroso) a Fe^{+3} (ión férrico), y los iones ferrosos son solubles en fluidos biológicos, por lo que en presencia de oxígeno (proveniente de moléculas orgánicas encontradas en el organismo) genera radicales hidroxilo perjudiciales para el organismo. Mecanismos homeostáticos evitan la absorción excesiva del Fe en el intestino proximal (esófago, estómago, mitad proximal del duodeno, hígado y páncreas) y regulan la velocidad de la liberación de este. Jomova (2011) explica que el efecto tóxico de Fe libre es corroborado por su capacidad para catalizar a través de la reacción de Fenton $[\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \longrightarrow \text{Fe}^{+3} + \bullet\text{OH} + \text{OH}^-]$ la generación de radicales libres reactivos hidroxilo. La producción de $\bullet\text{OH}$ cerca del ADN podría conducir a este radical a reaccionar con las bases de ADN para producir bases dañadas o romper la cadena de ADN.^[53] Debido a la importancia de lo mencionado anteriormente, se evaluó la relación Zn/Fe en el grupo de niños autistas y en el grupo de control. El diagrama de caja y bigote se muestra en la figura 15.

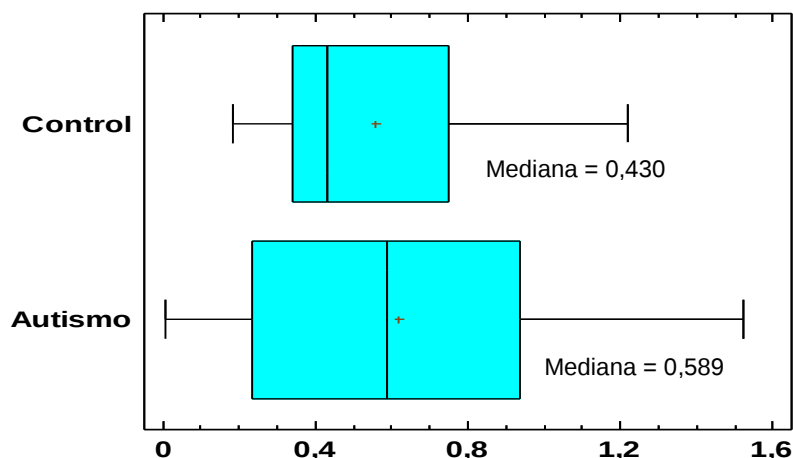


Figura 15. Diagrama de caja y bigote de la relación Zn/Fe en suero sanguíneo.

Para la relación Zn/Fe se obtuvieron valores de mediana menores a los obtenidos en la relación Zn/Cu, esto se debe a la mayor cantidad de Fe presente. Esta relación no presento diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupo según la prueba U de Mann-Whitney con un valor de $p = 0,848$. A pesar de que no se encontró información tabulada acerca de la relación Zn/Fe en el suero sanguíneo, se cree que el exceso del Fe está relacionado de una u otra manera con la deficiencia de Zn.

En base a lo mencionado, 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 a los mismos.

9. CONCLUSIONES

- Se observó niveles bajos de Ca y Zn en las muestras de suero sanguíneo del grupo de niños autistas y grupo de niños control.
- En el cabello, los niveles de Fe y Zn se ubican por debajo del intervalo de referencia para ambos grupos, además el Cu también se encuentra por debajo del rango para el grupo de niños autistas.
- No existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de los elementos Ca, Fe, Zn, Cu y Mg entre el grupo de niños autistas y el grupo de niños control para ninguno de los dos tipos de muestra (suero sanguíneo y cabello).
- La relación Zn/Cu en los niños autistas fue menor que en los niños control, sin embargo no se pudo comprobar que existan diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.
- Los resultados obtenidos para la relación Zn/Cu en las muestras de suero sanguíneo concuerdan con lo reportado en investigaciones internacionales. Por su parte, el cabello no fue útil para evaluar esta relación, pero si para determinar la carga metálica en el organismo.
- Debido a que ambos grupos presentaron concentraciones similares en todos los elementos de cada muestra, se sugiere que los niños autistas no están bajo sobredosis de suplementos vitamínicos.
- Se descarta la presencia de estrés oxidativo ocasionado por niveles elevados de Cu, sin embargo, se cree que los niveles elevados de Fe podrían contribuir a la aparición del mismo.

10. RECOMENDACIONES

- Apoyar este tipo de investigaciones, en pro de contribuir con el desarrollo de análisis que sirvan como herramientas útiles para la elaboración de diagnósticos por parte de médicos venezolanos, así como también para establecer teorías que describan el desarrollo de enfermedades.
- Extender este estudio empleando una mayor población de niños control con el fin de establecer los valores de referencia para la población infantil venezolana.
- Extender este estudio, evaluando poblaciones más grandes, incluyendo progenitores y población adulta, de manera que pueda establecerse relaciones entre la acumulación de metales y el factor genético y la acumulación de metales y la edad.
- Estudiar más a fondo la posible relación entre la acumulación de Fe y la deficiencia de Zn en muestras de suero sanguíneo.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- [1] Yasuda, H., Yasuda Y. & Tsutsui T. (2013) Estimation of autistic children by metallomics analysis. *Scientific Reports*. 3:1199; doi: 10.1038/srep01199
- [2] Noris, E., Rodríguez A., Whilby M., Ramos, L., Robinson, M & Pérez, A. (2013) Niveles de plomo y daño en el ADN de niños con trastorno del espectro autista. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*. 2013; 51 (1):16-26
- [3] Melendez, L., Dos Santos, D., Polido L., Lopes, M., Sella, S., Querino, L. & Silva-Filho, E. (2013) Aluminum and Other Metals May Pose a Risk to Children with Autism Spectrum Disorder: Biochemical and Behavioral Impairments. *Clinical and Experimental Pharmacology* 3: 120. doi:10.4172/2161-1459.1000120
- [4] Raymond, L., Deth, R. & Ralston, N. (2014) Potential Role of Selenoenzymes and Antioxidant Metabolism in relation to Autism Etiology and Pathology. *Hindawi Publishing Corporation. Autism Research and Treatment*.doi: 10.1155/2014/164938
- [5] Akyuzlu, D., Kayaalti, Z., Soylemez, E. & Soylemezoglu T. (2014) Association between Autism and Arsenic, Lead, Cadmium, Manganese Levels in Hair and Urine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* (2014) 140-144
- [6] Torrente, M., Gascon, M., Vrijheid M., Sunyer, J., Forns, J., Domingo J. & Nadal, M. (2013) Levels of Metals in Hair in Childhood: Preliminary Associations with Neuropsychological Behaviors. *Toxics*.2014, 2, 1-16; doi:10.3390/toxics2010001
- [7] Balbuena Rivera, Francisco. (2007). Breve Revisión Histórica del Autismo. *Revista de la Asociación Española de la Neuropsiquiatría*. V.27 n.2. doi: 10.4321/S0211-57352007000200006
- [8] Cuxart Francesc. (2000) El Autismo: Aspectos Descriptivos y Terapéuticos. Málaga. Ediciones Aljibe.

- [9] National Rehabilitation Information Center. Una breve Historia de Autismo. (2012) [En Línea]. Disponible en: <http://naricspotlight.wordpress.com/2012/04/18/1610/> (Consultado: 20/08/2014).
- [10] National Institute of Mental Health. Guía para Padres sobre el Trastorno del Espectro Autista. [En Línea]. Disponible en: <http://www.nimh.nih.gov/health/publications/espanol/gu-a-para-padres-sobre-el-trastorno-del-espectro-autista/index.shtml> (Consultado 18/08/2014).
- [11] Center for Disease Control and Prevention. Autism. [En Línea]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/ncbddd/autism/facts.html> (Consulta: 20/08/2014).
- [12] Sandoval, A., Moyano, A y Barrera (2012). Trastorno Generalizado del Desarrollo No Especificado. Una reflexión sobre este diagnóstico. *Revista Chilena Neuro-Psiquiat* 2012; 50 (3): 202-203
- [13] Blanco, N., Manresa, V., Mesch, G. y Melgarejo, M. (2006) Síndrome de Rett: Criterios Diagnósticos. *Revista de Postgrado de la Vía Cátedra de Medicina*. Nº 153.
- [14] Rodríguez, J. (2012) Trastorno Desintegrativo Infantil: una alteración del desarrollo desconocida. [En Línea]. Disponible en: www.consumer.es/web/salud/psicologia/2012/02/19/206809.php (Consulta: 21/08/2014).
- [15] Sociedad para la Ayuda del Autismo Ahora. (2004) Manual Médico para el Autismo. [En Línea]. Disponible en: http://www.helpautismnow.com/PH_Spanish_b_PDF.pdf (Consulta: 25/08/2014).
- [16] Adams, J., Audhya, T., McDonough-Means, S., Rubin, R., Quig, D., Geis, E., Gehn, E., Loresto, M., Mitchell, J., Atwood, S., Barnhouse S. & Lee, W. (2011) Effect of a vitamin / mineral supplement on children and adults with autism. *BMC Pediatrics*.doi: 10.1186/1471-2431-11-111

- [17] Montilla, L. (2011). Determinación de elementos trazas en cabello y suero sanguíneo de niños con síndrome de espectro autista. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- [18] Autismo IDEA. (2013). Hipótesis Sobre las Causas del Autismo. [En Línea]. Disponible en: <http://www.aba-autismo.com/hipotesis-sobre-las-causas-del-autismo/> (Consulta: 29/08/2014).
- [19] Blaurock-Busch, E., Amin, O., Dessoki H. & Rabah T. (2012) Toxic Metals and Essential Elements in Hair and Severity of Symptoms among Children with Autism. *Mædica: A Journal of Clinical Medicine*. Volumen 7 N° 1. 2012.
- [20] Russo A.J. & DeVito R. (2011). Analysis of Copper and Zinc Plasma Concentration and the Efficacy of Zinc Therapy in Individuals with Asperger's Syndrome, Pervasive Developmental Disorder Not Otherwise Specified (PDD-NOS) and Autism. *Biomarker Insights*. doi: 10.4137/BMI.S7286
- [21] Hou, Xiandeng & Jones, Bradley (2000). Inductively Coupled Plasma/Optical Emission Spectrometry. [En Línea]. Disponible en: <http://www.wfu.edu/chemistry/courses/jonesbt/334/icpreprint.pdf> (Consulta: 07/09/2014).
- [22] Analytical Instruments (2013). Inductive Coupled Plasma Optical Emission Spectrometer. [En Línea]. Disponible en: <http://analyticalprofessional.blogspot.com/2013/06/inductive-coupled-plasma-optical.html> (Consulta: 08/09/2014).
- [23] Skoog, D., Holler, F. Y Nieman, T. (2001) Principios de Análisis Instrumental. 5ta edición. McGRAW-HILL. Madrid, España. Págs. 226 -227.

- [24] Castillo, E. (2010). Determinación de Zn, Pb, Cd, Cu, Cr, Se y Hg en cabello y orina de niños con síndrome de espectro autista mediante técnicas de espectroscopia atómica. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- [25] Aranda, P; Planells, E & Llopis J. (2000). Magnesio Scientific Communication: Art o Technique? *Revista Ars Pharmaceutica*, 41: 1; 91-100, 2000.
- [26] Medline Plus. (2013). Hierro en la dieta. [En Línea]. Disponible en: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/002422.htm> (Consulta: 10/09/2014).
- [27] Nattural Saluzvir. Cobre. [En Línea]. Disponible en: <http://www.rdnattural.es/plantas-y-nutrientes-para-el-organismo/minerales/cobre/> (Consulta: 11/09/2014).
- [28] Huerta M., Ortega M., Cobos M., Herrera J., Díaz A., & Guinzbert R. (2005). Estrés oxidativo y el uso de antioxidantes en animales doméstico. *Asociación Interciencia* v30. N.12.
- [29] Rosales, M., (2009). Estudio del contenido de elementos trazas en cabello y orina de niños con síndrome del espectro autista. Tesis de Licenciatura, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela.
- [30] Plan Nacional de Sangre. ¿Qué es la sangre? [En Línea]. Disponible en: http://www.msal.gov.ar/plan-nacional-sangre/index.php?option=com_content&id=315&Itemid=39 (Consulta: 09/03/2015).
- [31] Anatomía del sistema cardiovascular. [En Línea]. Disponible en: <http://www.anatomiahumana.ucv.cl/morfo2/sangre.html> (Consulta: 09/03/2015).
- [32] Salud. Enciclopedia de salud dietética y psicología. Composición de la sangre. [En Línea]. Disponible en: <http://www.encyclopediasalud.com/categorias/cuerpo-humano/articulos/composicion-de-la-sangre> (Consulta: 09/03/2015).

[33] Micro Trace Minerals. Laboratorio Clínico. ¿Por qué hay metales en la sangre? [En Línea]. Disponible en: <http://www.microtrace.eu/es/diagnostico-de-laboratorio/analisis-de-sangre/> (Consulta: 12/03/2015).

[34] Salud 180 El estilo de vida saludable. Cabello. [En Línea]. Disponible en: <http://www.salud180.com/salud-z/cabello> (Consulta: 12/03/2015).

[35] ¿Qué es el cabello? [En Línea]. Disponible en: http://thehistoryofthehairsworld.com/que_es_el_cabello.html (Consulta: 12/03/2015).

[36] Micro Trace Minerals. Laboratorio Clínico. Mineralograma del cabello. [En Línea]. Disponible en: <http://www.microtrace.eu/es/diagnostico-de-laboratorio/analisis-de-cabello/> (Consulta: 15/03/2015).

[37] Nutriceutics. Análisis de cabello para la determinación de elementos tóxicos y esenciales. [En Línea]. Disponible en: <http://www.nutriceutics.net/mineralograma.asp> (Consulta: 15/03/2015).

[38] Cespón R. Rosa M. “Desarrollo de métodos analíticos automáticos para la determinación de metales en el medio ambiente laboral”. Universidad Santiago de Compostela. Capítulo I. Introducción. Pág. 60-61.

[39] Silva T., Marino O., Alarcón A., Ramírez M. y Mejías A. “Niveles séricos de cinc (Zn), hierro (Fe) y cobre (Cu) de preescolares que acuden a consulta en los ambulatorios urbanos tipo III de la ciudad de Mérida”. MedULA, Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes. Vol. 12 N°1-4. 2003. (2005). Mérida. Venezuela.

[40] Robert Lauwerys. Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. Capítulo 27. Control Biológico. Págs. 27.8 - 27.11.

[41] Hiuci A. NTP 109: Valores límites biológicos para el control de exposición a metales. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. España. Año 1984.

[42] Línea y Salud. “metales pesados o metales tóxicos”. [En Línea]. Disponible en: <http://www.lineaysalud.com/metales-pesados-o-metales-toxicos> (Consulta: 08/04/2015).

[43] EcuRed. Conocimiento con todos y para todos. “Efecto de los metales pesados en la salud humana” [En Línea]. Disponible en: http://www.ecured.cu/index.php/Anexo:Efecto_de_los_metales_pesados_en_la_salud_humana (Consulta: 08/04/2015).

[44] Saz, P., Gálvez J., Ortiz, M. y Saz, S. (2010) “Oligoterapia. Fundamentos”. *ELSEVIER*, Vol.30 Núm. 06. 2010.

[45] Cuidados de la Salud. ¿Qué es la orina, cuál es su función y cómo está compuesta? [En Línea]. Disponible en: <http://www.cuidadodelasalud.com/salud/que-es-la-orina-cual-es-su-funcion-y-como-esta-compuesta/> (Consulta: 08/04/2015).

[46] Evans Analytical Group. Inductively Coupled Plasma Spectroscopy. [En Línea]. Disponible en: <http://www.eag.com/mc/inductively-coupled-plasma-spectroscopy.html> (Consulta: 09/04/2015).

[47] Al-Farsi, Y., Waly, M., Al-Sharbaty, M., Al-Shafae, M., Al-Farsi, O., Al-Khaduri, M., Gupta, I., Ouhtit, A., Al-Adawi, S., Al-Said M. & Deth, R. (2012) Levels of Heavy Metal and Essential Minerals in Hair Samples of Children with Autism in Oman : a Case-Control Study. *Springer*. doi:10.1007/s12011-012-9553-z

[48] Li, S., Wang, J., Bjørklund, G., Zhao, W. & Yin, C. (2014) Serum copper and zinc levels in individuals with autism spectrum disorders. *NeuroReport* doi: 10.1097/WNR.0000000000000251

[49] Bjørklund G. (2013) The role of zinc and copper in autism spectrum disorders. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*. 2013,73: 225-236

- [50] Faber, S., Zinn, G., Kern II, J. & Skip, H. (2009) The plasma zinc/serum copper ratio as a biomarker in children with autism spectrum disorders. *Biomarkers*, 2009; 14(3): 171–180
- [51] Wayne, D. “BIOESTADÍSTICA. Base para el análisis de las ciencias de la salud” 4^a ed. Editorial: LIMUSA, México 2009. Capítulo 13: Estadística no paramétrica y de libre distribución. 13.6: Prueba de Mann-Whitney. Pág. 678 – 683.
- [52] León G. Métodos Estadísticos. Diagrama de caja y bigote. [En Línea]. Disponible en: http://webdelprofesor.ula.ve/economia/gudberto/materias/metodos_estadisticos1/guias_apuntes/diagramas_de_caja.pdf (Consulta: 22/04/2015).
- [53] Jomova, K. & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *ELSEVIER (Toxicology)* doi: 10.1016/j.tox.2011.03.001
- [54] Miller J. & Miller J. Estadística y Quimiometría para Química Analítica. 4^{ta} edición. Pearson Education. Capítulo 5: métodos de calibración en análisis instrumental. Pág. 125-126.

12. APENDICES

Apéndice 1. Tríptico informativo entregado a los padres de los niños con TEA.

Por su parte, la muestra de cabello será suministrada por el representante del niño (a) . Para ello, deben lavar el cabello, una vez este seco cortar aproximadamente 1,00 g de cabello de la región occipital de la cabeza del infante. El corte debe realizarse lo más cercano posible al cuero cabelludo . Seguidamente se debe colocar los mechones de cabello en una bolsa plástica con cierre hermético identificada con el nombre del infante.



7.) ¿Qué niños participan?

Niños (as) que presentan y que no presentan autismo cuyas edades estén comprendidas entre 3 y 14 años.

8.) ¿Dónde se realizan los análisis?

Los análisis se llevarán a cabo en los Laboratorios pertenecientes al Centro de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la UCV.

9.) ¿Quién dirige el estudio?

El estudio se trata de un Trabajo Especial de Grado el cual es dirigido por el Dr. José Chirinos, profesor de Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela.



**Centro de Química
Analítica**

*"El hombre encuentra a Dios detrás
de cada puerta que la Ciencia logra
abrir".*
Albert Einstein

Ely A. Charis H.
Teléfono: 0412 805 3889
Correo: adrianacharris@hotmail.com

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUÍMICA



**DETERMINACION DE
ELEMENTOS
ESENCIALES EN
CABELLO Y SUERO
SANGUINEO DE NIÑOS
QUE PRESENTAN EL
ESPECTRO AUTISTA**

Realizado por:
Ely A. Charis H.
Caracas, Junio de 2014.

(Cara A)

Apéndice 1. Tríptico informativo entregado a los padres de los niños con TEA. (Continuación)

Preguntas Frecuentes

1.) ¿Para que sirve el análisis de metales en niños con espectro autista?

Este tipo de análisis permite obtener información acerca del estado del organismo, no es específico para personas con autismo, sino que puede aplicarse a personas que presente cualquier tipo de patología.

El análisis es útil para determinar la existencia o ausencia de diversos metales en el cuerpo del paciente, así como también logra determinar si la cantidad del metal presente en el cuerpo representa un déficit o exceso del mismo. Estos metales pudieran resultar "esenciales" o "tóxicos" para el organismo humano.



Los elementos esenciales son todos aquellos que participan en el desarrollo adecuado del individuo, así como también en el buen funcionamiento de todo su organismo; siempre y cuando estos se mantengan dentro de un intervalo específico establecido por la Organización Mundial de la Salud.

Por su parte, los elementos tóxicos corresponden a aquellos metales pasados que no intervienen ningún proceso del organismo. Son caracterizados por no contribuir con ningún beneficio para el ser humano. La constante exposición a estos, su inadecuada excreción y/o altas concentraciones en el cuerpo humano tienden a alterar su funcionamiento.

El conocimiento de la carga metálica en el cuerpo humano, es de gran importancia, considerando que últimamente se ha asociado su déficit o exceso (en el caso de elementos esenciales), con la aparición y/o desarrollo de múltiples enfermedades.

El objetivo principal de la investigación es verificar si existen correlaciones entre el autismo y el contenido metálico en el cuerpo del infante. Adicionalmente se pretenden realizar comparaciones entre los resultados obtenidos para niños con y sin autismo, así como también niños con autismo y su progenitora.



2.) ¿Por qué cabello y suero sanguíneo?

Cada espécimen, de suero sanguíneo o de cabello provee información específica y algo limitada. Sin embargo, si se combinan los resultados de las pruebas de varios especímenes corporales, se obtiene una visión más amplia con relación a los procesos metabólicos. Ninguna prueba de laboratorio es superior a otra. Cada prueba tiene validez.

El cabello presenta la ventaja de contar con memoria a largo plazo. Este absorbe los minerales del torrente sanguíneo, a través de sus raíces.

Las sustancias permanecen conforme crece el cabello, esto es, generalmente, a una velocidad de 1,25 cm por mes. Por lo tanto, una longitud de cabello de 7,5 cm de la porción más cercana al cuero cabelludo ofrece una historia de 6 meses.

Por otra parte, la sangre, proporciona información desde el momento que en el niño (a) nace, además

proporciona información genética y no está expuesta a contaminaciones exteriores.

3.) ¿Qué metales se analizarán?

Se analizarán metales esenciales como: Zinc (Zn), Cobre (Cu), Magnesio (Mg); Hierro (Fe) y Calcio (Ca). Además es probable que se realice un despiñaje de algunos metales tóxicos como el Mercurio (Hg) y el Cadmio (Cd).

4.) Beneficios a Futuro:

- ♦ Desarrollar métodos que permitan el análisis de distintas muestras biológicas (cabello y suero sanguíneo) para incentivar la aplicación de estos análisis en el país y que presenten un costo accesible.
- ♦ Contribuir con el desarrollo o avance de investigaciones acerca del autismo que pudieran ser útiles para mejorar el tratamiento del mismo.



5.) ¿Costo del análisis?

El análisis de las muestras será totalmente gratuito ya que se trata de un trabajo de investigación.

6.) ¿Cómo será la recolección de muestras?

Se contará con el apoyo profesional de los bioanalistas Lic.: Diego Pitre y Lic.: Vanessa Hudson, para realizar la jorana de recolección de muestras (suero sanguíneo).

(Cara B)

Apéndice 2. Encuesta aplicada a los padres y/o representantes de los niños que participaron en el estudio.



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



PROTOCOLO: Niveles medios de Zinc (Zn), Hierro (Fe), Cobre (Cu), Magnesio (Mg) y Calcio (Ca) en la población.

1. IDENTIFICACIÓN DEL INFANTE			
Nombres:		Apellidos:	
Edad:		Fecha y Lugar de nacimiento:	
Dirección/ Teléfono de contacto:			
2. ANTECEDENTES			
Patología que presenta:			
Medicamentos administrados en los últimos 6 meses:			
¿El niño (a) toma vitaminas?	Sí		Multi-vitaminas (Indique):
	No		Específicas (Indique):
Patologías de la madre:			
Patologías del padre:			
¿Existen otros casos de autismo en su familia?/ ¿Qué parentesco existe entre esa(s) personas y el infante?			
Vacunas aplicadas al infante:			

Apéndice 2. Encuesta aplicada a los padres y/o representantes de los niños que participaron en el estudio. (Continuación)

¿El niño (a) ha sido quelado? Especifique									
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									
4. 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				
5. 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	

Apéndice 2. Encuesta aplicada a los padres y/o representantes de los niños que participaron en el estudio. (Continuación)

Café:	Si		Desde		Tipo		Frecuencia:
	No		Hasta		Cantidad		
Drogas:	Si		Desde		Tipo		Frecuencia:
	No		Hasta		Cantidad		
6. ¿POSEE AMALGAMAS DENTALES?							
Niño	Si		Cantidad:				
	No						
Madre	Si		Cantidad:				
	No						
Padre	Si		Cantidad:				
	No						
7. ¿POSEE PRÓTESIS METÁLICAS?							
Niño	Si		Cantidad				
	No						
Madre	Si		Cantidad				
	No						
Padre	Si		Cantidad				
	No						
8. MUESTRA ENTREGADA							
Suero Sanguíneo:	Si		Observaciones:				
	No						
Cabello:	Si		Observaciones:				
	No						

Este estudio tiene como objetivo recolectar información útil para el análisis de los metales previamente mencionados presentes en el cuerpo, de manera de establecer una relación entre el niño (a) y el grado de autismo que presenta, e influencia de la dieta diaria en la absorción de los metales. Las muestras biológicas, datos y resultados obtenidos serán utilizados únicamente para fines de investigación y bajo el consentimiento del representante del niño (a).

Firma del Representante

¡Gracias por su valiosa colaboración!

Br. Ely A. Charris H.

Apéndice 3. Distribución por edad y sexo de los niños que participaron en el estudio.

Edad	Niños Totales	Grupo Control		Grupo Autismo	
		Niños	Niñas	Niños	Niñas
2	2	0	1	0	1
3	2	0	1	1	0
4	7	0	1	5	1
5	9	2	4	3	0
6	4	1	0	3	0
7	3	0	0	2	1
8	3	2	1	0	0
9	3	0	0	3	0
10	1	0	0	0	0
11	2	1	0	1	0
12	4	1	1	1	1
14	3	1	1	1	0
Niños Totales por Grupo	42	8	10	20	4

Apéndice 4. Límite de cuantificación del método para las muestras de suero sanguíneo y cabello.

El límite de cuantificación del método corresponde a la concentración mínima de un analito que puede ser cuantificada en una matriz real, esta mínima concentración produce una señal cuantificable con un nivel de confianza definido. A continuación se presenta el límite de cuantificación del método empleado para cada una de las muestras.

Elemento	Tipo de Muestra	
	Suero Sanguíneo (µg/L)	Cabello (µg/Kg)
Ca	21,70	8,68
Mg	150,5	60,20
Fe	28,30	11,33
Zn	28,30	11,33
Cu	6,41	2,56
Al	1,78	0,71
Cr	1,78	0,71
Pb	1,78	0,71

Apéndice 5. Concentraciones de elementos en muestras de suero sanguíneo de los niños autistas.

Muestra	Ca [mg/L]	Fe [mg/L]	Zn [mg/L]	Cu [mg/L]	Mg [mg/L]	Al [mg/L]	Cr [mg/L]	Pb [mg/L]
M8	81,73	0,735	0,179	0,571	21,18	< LC	< LC	0,156
M11	82,28	1,615	0,251	0,996	21,09	< LC	< LC	< LC
M12	74,37	0,727	0,269	0,771	17,70	< LC	< LC	< LC
M13	87,66	1,346	0,283	0,724	19,27	< LC	< LC	0,219
M15	84,26	1,315	0,272	1,112	19,72	< LC	< LC	< LC
M16	80,8	9,763	0,582	0,764	19,60	< LC	< LC	< LC
M17	81,62	5,474	0,037	0,852	19,83	< LC	< LC	0,231
M18	87,09	2,524	0,647	0,589	22,10	< LC	< LC	0,219
M21	87,42	1,001	0,230	0,436	22,20	< LC	< LC	< LC
M23	85,86	1,280	0,668	0,255	20,74	< LC	< LC	< LC
M26	80,03	1,238	1,280	0,790	17,36	< LC	< LC	< LC
M28	85,05	0,994	1,512	0,765	23,62	< LC	< LC	< LC
M30	81,87	0,904	0,876	1,130	18,47	< LC	< LC	< LC
M31	78,78	1,166	0,995	1,073	20,00	< LC	< LC	< LC
M33	77,87	1,144	0,964	1,028	20,65	< LC	< LC	< LC
M35	80,49	1,750	1,054	0,830	19,00	< LC	< LC	< LC
M37	83,13	1,534	0,988	0,727	19,28	< LC	< LC	< LC
M41	75,11	0,598	0,749	1,521	19,12	< LC	< LC	< LC
M43	79,52	1,034	0,934	1,731	17,48	< LC	< LC	< LC
M44	74,1	0,707	0,813	0,582	19,57	< LC	< LC	< LC
M45	80,78	1,571	0,848	0,632	20,42	< LC	< LC	< LC
M46	77,98	0,993	0,981	0,991	19,26	< LC	< LC	< LC
M47	81,68	1,249	0,854	1,128	18,41	< LC	< LC	< LC
M49	75,29	1,016	0,586	0,973	18,11	< LC	< LC	< LC

- LC = Límite de Cuantificación

Apéndice 6. Concentraciones de elementos en muestras de suero sanguíneo de los niños control.

Muestra	Ca [mg/L]	Fe [mg/L]	Zn [mg/L]	Cu [mg/L]	Mg [mg/L]	Al [mg/L]	Cr [mg/L]	Pb [mg/L]
M2	80,14	1,410	0,500	0,929	19,52	< LC	< LC	< LC
M3	80,37	1,352	0,459	0,678	20,74	< LC	< LC	< LC
M4	80,96	1,359	0,513	0,763	19,75	0,309	< LC	0,118
M5	79,21	0,893	0,253	0,771	19,69	< LC	< LC	< LC
M10	81,45	0,873	0,279	0,681	18,91	1,341	0,011	0,118
M19	84,88	2,230	0,405	0,707	22,67	< LC	0,257	0,199
M20	89,56	1,546	0,444	1,096	23,28	< LC	< LC	< LC
M24	86,9	0,856	0,372	0,801	20,26	< LC	< LC	0,441
M25	90,48	1,005	0,382	0,508	20,98	< LC	< LC	< LC
M27	80,58	0,887	0,990	1,667	18,56	< LC	< LC	< LC
M29	82,48	1,940	0,828	1,610	18,89	< LC	< LC	< LC
M32	79,52	1,103	0,808	0,879	20,78	3,118	< LC	< LC
M34	82,4	1,264	0,945	0,805	19,76	< LC	< LC	< LC
M36	86,77	0,895	1,092	0,881	20,60	4,068	< LC	< LC
M38	80,91	1,550	0,907	0,891	20,30	4,155	< LC	< LC
M40	76,08	1,161	0,957	0,808	21,93	< LC	< LC	< LC
M42	78,78	1,178	0,779	1,307	17,24	< LC	< LC	< LC
M50	81,8	0,914	0,697	1,009	19,06	< LC	< LC	< LC

- LC = Límite de Cuantificación

Apéndice 7. Concentraciones de elementos en muestras de cabello de los niños autistas.

Muestra	Ca [mg/Kg]	Fe [mg/Kg]	Zn [mg/Kg]	Cu [mg/Kg]	Mg [mg/Kg]	Al [mg/Kg]	Cr [mg/Kg]	Pb [mg/Kg]
M8	-	-	-	-	-	-	-	-
M11	139,10	5,6195	59,74	8,68	9,06	< LC	< LC	1,039
M12	305,90	5,691	88,26	6,28	49,51	< LC	< LC	< LC
M13	243,40	19,39	114,20	10,27	35,82	< LC	< LC	0,536
M15	129,70	10,28	51,36	14,04	16,26	< LC	< LC	2,769
M16	126,70	11,15	50,43	4,50	15,74	< LC	< LC	< LC
M17	130,70	4,142	78,73	7,20	43,98	21,020	< LC	< LC
M18	-	-	-	-	-	-	-	-
M21	202,30	5,73	94,15	15,62	21,57	< LC	0,183	< LC
M23	60,53	4,5035	97,01	4,64	9,78	< LC	< LC	< LC
M26	-	-	-	-	-	-	-	-
M28	-	-	-	-	-	-	-	-
M30	216,60	5,136	66,84	162,50	27,79	< LC	< LC	< LC
M31	-	-	-	-	-	-	-	-
M33	140,80	5,206	56,95	10,43	16,03	< LC	< LC	3,079
M35	226,10	6,207	48,80	7,65	40,58	23,045	< LC	< LC
M37	96,16	4,5135	106,15	4,52	6,45	< LC	< LC	2,339
M41	202,40	14,515	159,05	6,50	15,54	< LC	< LC	< LC
M43	-	-	-	-	-	-	-	-
M44	195,40	4,852	112,45	11,97	22,48	< LC	< LC	0,673
M45	-	-	-	-	-	-	-	-
M46	60,98	13,51	56,15	4,03	26,81	< LC	< LC	< LC
M47	165,40	4,4725	54,62	5,70	16,22	< LC	< LC	< LC
M49	-	-	-	-	-	-	-	-

- LC = Límite de Cuantificación

Apéndice 8. Concentraciones de elementos en muestras de cabello de los niños control.

Muestra	Ca [mg/Kg]	Fe [mg/Kg]	Zn [mg/Kg]	Cu [mg/Kg]	Mg [mg/Kg]	Al [mg/Kg]	Cr [mg/Kg]	Pb [mg/Kg]
M2	173,1	5,45	355,35	10,38	42,76	< LC	< LC	3,77
M3	183,7	4,28	104,35	5,23	8,75	21,60	< LC	< LC
M4	285,7	6,43	479,90	2,91	27,64	26,32	< LC	< LC
M5	-	-	-	-	-	-	-	-
M10	91,37	12,25	64,03	99,56	17,54	< LC	< LC	< LC
M19	-	-	-	-	-	-	-	-
M20	-	-	-	-	-	-	-	-
M24	100,8	4,36	51,02	10,34	29,71	23,44	0,19	< LC
M25	66,86	5,24	44,46	10,15	13,97	< LC	< LC	< LC
M27	165,3	8,54	31,21	73,99	15,74	< LC	< LC	< LC
M29	149,4	5,64	52,56	20,85	11,41	< LC	< LC	1,26
M32	96	9,31	31,77	36,16	12,27	< LC	< LC	2,75
M34	201,1	7,49	122,65	4,55	14,81	< LC	< LC	1,85
M36	-	-	-	-	-	-	-	-
M38	47,93	4,57	72,34	6,84	3,42	< LC	< LC	< LC
M40	169,6	5,95	67,87	7,10	33,42	< LC	< LC	5,48
M42	55,26	5,36	18,59	2,99	3,89	23,24	< LC	< LC
M50	-	-	-	-	-	-	-	-

- LC = Límite de Cuantificación

Apéndice 9. Relación Zn/Cu para las muestras de suero sanguíneo y cabello del grupo de niños autistas.

Muestra	Suero Sanguíneo	Cabello
M8	0,313	-
M11	0,252	6,88
M12	0,350	14,05
M13	0,390	11,12
M15	0,245	3,66
M16	0,761	11,20
M17	0,043	10,94
M18	1,099	-
M21	0,528	6,03
M23	2,615	20,93
M26	1,620	-
M28	1,977	-
M30	0,775	0,41
M31	0,927	-
M33	0,938	5,46
M35	1,270	6,38
M37	1,359	23,49
M41	0,492	24,46
M43	0,540	-
M44	1,397	9,39
M45	1,341	-
M46	0,990	13,94
M47	0,757	9,58
M49	0,602	-

Apéndice 10. Relación Zn/Cu para las muestras de suero sanguíneo y cabello del grupo de niños control.

Muestra	Suero Sanguíneo	Cabello
M2	0,538	34,23
M3	0,678	19,94
M4	0,672	164,80
M5	0,328	-
M10	0,409	0,64
M19	0,572	-
M20	0,406	-
M24	0,464	4,93
M25	0,752	4,38
M27	0,594	0,42
M29	0,514	2,52
M32	0,919	0,88
M34	1,173	26,93
M36	1,240	-
M38	1,018	10,58
M40	1,184	9,56
M42	0,596	6,22
M50	0,690	-

Apéndice 11. Prueba no paramétrica: U de Mann-Whitney.

La prueba U de Mann-Whitney es una prueba no paramétrica con la cual se identifican diferencias entre dos poblaciones basadas en el análisis de dos muestras independientes. La prueba calcula el llamado estadístico U , cuya distribución para muestras con más de 20 observaciones se aproxima bastante bien a la distribución normal. Los pasos para efectuar la prueba son los siguientes:

- Se combinan dos muestras en un arreglo ordenado, identificando los valores muestrales, de acuerdo con el grupo muestral al que pertenecen.
- Luego se determinan el tamaño de las muestras (n_1 y n_2). Si n_1 y n_2 son menores que 20, se consideran muestras pequeñas, pero si son mayores que 20, se consideran muestras grandes.
- En caso de muestras grandes, calcular el valor Z , pues en estas condiciones se distribuye normalmente.
- Ordenar los valores de menor a mayor, asignando el rango uno al valor más pequeño.
- Se calculan los valores de U_1 y U_2 , empleando la ecuación 1.

$$U_1 = n_1 n_2 + \frac{n_1 (n_1 + 1)}{2} - \Sigma R_1$$

$$U_2 = n_1 n_2 + \frac{n_2 (n_2 + 1)}{2} - \Sigma R_2$$

Ecuación 1

Donde:

U_1 y U_2 = valores estadísticos de U Mann-Whitney.

n_1 = tamaño de la muestra del grupo 1.

n_2 = tamaño de la muestra del grupo 2.

R_1 = sumatoria de los rangos del grupo 1.

R_2 = sumatoria de los rangos del grupo 2.

- Se elige el U más pequeño para comparar con los críticos de U Mann-Whitney de la tabla de probabilidades asociadas con valores pequeños.
- Y por último decidir si se acepta o se rechaza la hipótesis nula (H_0).
- Se rechaza H_0 , si $p(\text{valor}) < \alpha$ (nivel de significancia).

Apéndice 12. Formato de reporte de resultados entregado a los padres y/o representantes de los niños que participaron en el estudio.

 Centro de Química Analítica 			
Análisis de Elementos Esenciales y Potencialmente Tóxicos en Muestras de Suero Sanguíneo y Cabello			
Nombre del Paciente:	Edad:	ID de la(s) Muestra(s):	Técnica: ICP-OES

Análisis en Suero Sanguíneo		
Elementos Esenciales		
Elemento	Concentración [mg/L]	Intervalo de Referencia [mg/L]
Calcio		85 - 102
Hierro		0,5 - 1,2
Zinc		0,7 - 1,2
Cobre		0,7 - 1,6
Magnesio		16 - 26
Elementos Potenciales Tóxicos		
Elemento	Concentración [mg/L]	Intervalo de Referencia [mg/L]
Aluminio		< 0,01
Cromo		< 0,02
Plomo		< 0,25

LC = Límite de Cuantificación (No Detectable)

Nota: Los intervalos de referencia para el suero sanguíneo reportados en este informe corresponden a lo establecido según la Organización Mundial de la Salud, además son utilizados por distintos laboratorios clínicos en el país, y comprobados para el caso del Zn y Cu con estudios realizados en Venezuela.

Apéndice 12. Formato de reporte de resultados entregado a los padres y/o representantes de los niños que participaron en el estudio. (Continuación)

Análisis en Cabello		
Elementos Esenciales		
Elemento	Concentración [mg/Kg]	Intervalo de Referencia [mg/Kg]
Calcio		110 - 510
Hierro		8 - 15
Zinc		110 - 228
Cobre		8 - 37
Magnesio		15 - 56
Elementos Potenciales Tóxicos		
Elemento	Concentración [mg/Kg]	Intervalo de Referencia [mg/Kg]
Aluminio		< 8
Cromo		< 0,6
Plomo		< 3

LC = Límite de Cuantificación (No Detectable)

Nota: Los intervalos de referencia para el cabello reportados en este informe son representativos de una población control determinados por los Laboratorios extranjeros Docto's Data, Inc. (Illinois, Estados Unidos); y Micro Trace Minerals (Hersbruck, Alemania), pues no existen valores de referencia establecidos con seguridad, además estos pueden variar según la región.

Este estudio se realizó con el objetivo de recolectar información útil para el análisis de metales presentes en el cuerpo, de manera de establecer una relación entre el niño (a) y el grado de autismo que presenta además de la influencia de la dieta diaria en la absorción de los metales. Las muestras biológicas, datos y resultados obtenidos fueron utilizados únicamente para fines de investigación y bajo el consentimiento del representante del niño (a).

¡GRACIAS POR SU COLABORACIÓN!

*"El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la Ciencia logra abrir".
Albert Einstein*

Apéndice 14. Estimación del costo del proyecto.

Servicio	Cantidad	Día de trabajo[Bs]	Total [Bs]	
Bioanalista	2	350	700	
Gastos generados para la divulgación de la información				
Impresiones de trípticos informativos		Copias de encuestas realizadas		Total [Bs]
800		280		1.080
Materiales para la Recolección de Muestras				
Tubos para muestras sanguíneas [Bs]	Injectadoras y mariposas. [Bs]	Algodón y alcohol [Bs]	Curitas [Bs]	Total [Bs]
1200	300	100	100	1.700
Costo del análisis				
Técnica	Costo del análisis por cada elemento [Bs]	Número de elementos	Número de muestras	Total [Bs]
Análisis por Espectroscopia de Emisión Óptica con Plasma Inductivamente Acoplado (ICP-OES)	600	5	100	300.000
Total de gastos para la realización del proyecto [Bs]				303.480

Es importante destacar que el financiamiento para la realización del proyecto fue por parte del Centro de Química Analítica y de manera personal. Además la ejecución para la toma de muestras fue posible gracias a la colaboración de la Directora de SOVENIA, Sra. María Russo, Lic. En Bioanálisis Vanessa Hudson, especialista en toma de muestra infantiles Andy Sánchez y a la de los padres y representantes de todos los niños que conforman la población en estudio.