



Universidad
Norbert Wiener

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
PROGRAMA ACADÉMICO DE TECNOLOGÍA MÉDICA EN
LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA PATOLÓGICA
SEGUNDA ESPECIALIDAD EN HEMATOLOGÍA

Trabajo Académico

Concordancia entre el método en microplacas y cromatografía de alta
performace para la medición de Zinc protoporfirina en sangre humana, Lima,
Noviembre 2025

Para optar el Título de
Especialista en Hematología

Presentado por:

Autora: Cabanillas Espinoza, Carmen Elizabeth


Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2975-3562>

Asesor: Mg. Huaman Cardenas, Victor Raul

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6371-4559>

Lima – Perú


2025

 Universidad Norbert Wiener	DECLARACIÓN JURADA DE AUTORIA Y DE ORIGINALIDAD DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN		
	CÓDIGO: UPNW-GRA-FOR-033	VERSION: 01 REVISIÓN: 01	FECHA: 08/11/2022

Yo, Carmen Elizabeth Cabanillas Espinoza egresado de la Facultad de Ciencias de la salud y Escuela Académica Profesional de Tecnología médica / Escuela de Posgrado de la Universidad privada Norbert Wiener declaro que el trabajo académico: **“CONCORDANCIA ENTRE EL MÉTODO EN MICROPLACAS Y CROMATOGRAFÍA DE ALTA PERFORMACE PARA LA MEDICIÓN DE ZINC PROTOPORFIRINA EN SANGRE HUMANA, LIMA, NOVIEMBRE 2025”** Asesorado por el docente: Víctor Raúl Huamán Cárdenas DNI 70092305 ORCID <https://orcid.org/0000-0002-6371-4559> tiene un índice de similitud de 10 diez % con código oid: 14912:483972491 verificable en el reporte de originalidad del software Turnitin.

Así mismo:

1. Se ha mencionado todas las fuentes utilizadas, identificando correctamente las citas textuales o paráfrasis provenientes de otras fuentes.
2. No he utilizado ninguna otra fuente distinta de aquella señalada en el trabajo.
3. Se autoriza que el trabajo puede ser revisado en búsqueda de plagios.
4. El porcentaje señalado es el mismo que arrojó al momento de indexar, grabar o hacer el depósito en el turnitin de la universidad y,
5. Asumimos la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión en la información aportada, por lo cual nos sometemos a lo dispuesto en las normas del reglamento vigente de la universidad.




.....
Firma de autor

Lic. Carmen Elizabeth Cabanillas Espinoza
DNI: 73501621




.....
Firma Asesor

Mg. Víctor Raúl Huamán Cárdenas
DNI: 70092305

Lima, 25 de abril de 2025

ÍNDICE

Contenido

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA	4
1.1 <i>Planteamiento del problema</i>	4
1.2 <i>Formulación del problema</i>	5
1.2.1 Problema general	5
1.2.2 Problemas específicos	5
1.3 <i>Objetivos de la investigación</i>	6
1.3.1 Objetivo general.....	6
1.3.2 Objetivos específicos	6
1.4 <i>Justificación de la investigación</i>	6
1.4.1 Justificación teórica	6
1.4.2 Justificación metodológica.....	7
1.4.3 Justificación práctica.....	7
1.5 <i>Delimitaciones de la investigación.....</i>	7
1.5.1 Temporal.....	7
1.5.2 Espacial.....	8
1.5.3 Población o unidad de análisis	7
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	8
2.1 <i>Antecedentes.....</i>	9
2.1.1 Internacionales	9
2.1.2 Nacionales.....	11
2.2 <i>Bases teóricas.....</i>	12
2.2.1 Biosíntesis del grupo Hemo en mamíferos	12
2.2.2 Zinc protoporfirina (ZPP)	12
2.2.3 Intoxicación por plomo en humanos	12
2.2.4 Métodos de medición de Zinc protoporfirina.....	13
2.3 <i>Formulación de hipótesis</i>	16
2.3.1 Hipótesis alternativa (H1)	16
2.3.2 Hipótesis nula (H0)	16
2.3.3 Hipótesis específicas	16
CAPÍTULO III: METODOLOGÍA	18
2.4 <i>Método de la investigación.....</i>	18
2.5 <i>Enfoque de la investigación:</i>	18
2.6 <i>Tipo de investigación:</i>	18
2.7 <i>Diseño de la investigación:</i>	18
2.8 <i>Población, muestra y muestreo</i>	18
2.8.1 Población	18
2.8.2 Muestra	19
2.8.3 Muestreo	19
2.9 <i>Variables y operacionalización.....</i>	20

2.9.1	Variable Principal / Desenlace:.....	20
2.9.2	Variable exposición y/o covariables:	20
2.9.3	Variables Intervinientes:	20
2.9.4	Operacionalización de variables	21
2.10	<i>Técnicas e instrumentos de recolección de datos</i>	25
2.10.1	Técnicas	25
2.10.2	Descripción de instrumentos.....	26
2.10.3	Validación.....	26
2.10.4	Confiabilidad	26
2.11	<i>Plan de procesamiento y análisis de datos</i>	26
2.12	<i>Aspectos éticos</i>	27
CAPÍTULO IV: ASPECTOS ADMINISTRATIVOS		28
2.13	<i>Cronograma de actividades</i>	28
2.14	<i>Presupuesto</i>	30
REFERENCIAS.....		31
ANEXOS.....		33
ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA.....		33
ANEXO 2: INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....		36
ANEXO 3: REPORTE FINAL DE TURNITIN.....		1

CAPÍTULO I: EL PROBLEMA

1.1 Planteamiento del problema

El plomo es un metal tóxico que se encuentra en la superficie de la tierra. (1) La contaminación por este metal en humanos se asocia de manera significativa a las actividades laborales de los afectados, su ingreso al organismo se da principalmente por las vías respiratorias y digestivas. (2) En el Perú, la exposición a plomo está principalmente relacionada a la actividad minera. La contaminación no es sólo ocupacional, sino que afecta a la población que vive a los alrededores de las zonas de explotación o de almacenamiento. (3)

Entre los efectos que produce la intoxicación por plomo se encuentra la anemia ya que la acción tóxica de los metales se caracteriza generalmente por una acumulación y excreción excesivas de los precursores del hemo, el ácido delta-aminolevulínico (ALA) y las protoporfirinas totales, siendo de éstas una de las más estudiadas la zinc protoporfirina (ZPP). (3,4) Dichos metabolitos acumulados por efecto de la exposición a un tóxico son denominados Biomarcadores de efecto (BME). (5)

En el Perú, de acuerdo a las disposiciones de la Resolución Ministerial N° 400-2017 MINSA, por medio del Manual de Atención de personas expuestas a plomo, el manejo de persona expuestas indica que de encontrarse sintomatología compatible con intoxicación por plomo y que no pueda ser explicada por otra patología, el especialista definirá la necesidad de realizar la toma de muestra para el BME, la cual será enviada al laboratorio de referencia definido por el Instituto Nacional de Salud (INS). (6) Sin embargo, no se encuentra disponible la medición de BME en las instituciones de salud del país.

Es conocido que la medición de ZPP se realiza generalmente por hematofluorometría, empleando un flurómetro portátil en el cual se analiza una gota de sangre de la muestra problema directamente. Sin embargo, por esta metodología, la interferencia de otras sustancias fluorescentes en la muestra que pueden alterar la medición, razón por la que se recomienda emplear como muestra eritrocitos lavados ya que el proceso de lavado elimina las sustancias disueltas en el plasma que pueden emitir fluorescencia a una longitud de onda similar a la de la ZPP (2,7)

Existen otras metodologías como la cromatografía líquida de alta performance con detector de fluorescencia (HPLC-FI) que han demostrado tener mayor sensibilidad y especificidad que la prueba por fluorometría, sin embargo, se requiere de un equipo de

cromatografía especialmente calibrado y cumplir con condiciones especiales para este procedimiento. (2,8)

El presente trabajo tiene por finalidad estandarizar una nueva metodología de medición de este analito y determinar su concordancia con la metodología gold estándar de HPLC-FI abriendo la posibilidad de ofrecer un nuevo formato, con menor interferencias que la hematofluorimetría y que permita trabajar con una mayor cantidad de muestras por corrida analítica facilitando así su incorporación en los estudios y seguimientos en población expuesta a contaminación por plomo.

1.2 Formulación del problema

1.2.1 Problema general

- ¿Existe un grado de concordancia aceptable entre el método en microplacas y la cromatografía de alta performance (HPLC) para la medición de zinc protoporfirina en muestras de sangre humana?

1.2.2 Problemas específicos

- ¿Cuál es la concentración de zinc protoporfirina obtenida por el método método en microplacas en las muestras de sangre humana?
- ¿Cuál es la concentración de zinc protoporfirina obtenida por el método HPLC en las muestras de sangre humana?
- ¿Cuál es la diferencia promedio y cuáles son los límites de acuerdo del 95% entre las mediciones de zinc protoporfirina obtenidas por el método en microplacas y el método HPLC en la misma muestra de sangre humana?
- ¿Cuál es el valor del Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) para las mediciones de zinc protoporfirina obtenidas por ambos métodos?
- ¿La concordancia entre el método en microplacas y el método HPLC para la medición de zinc protoporfirina varía la edad, el sexo y el Diagnóstico/Condición Clínica Relevante de los pacientes?
- ¿Son los resultados de la medición de zinc protoporfirina obtenidos por el método en microplacas clínicamente intercambiables con los obtenidos por el método HPLC?

1.3 Objetivos de la investigación

1.3.1 Objetivo general

Evaluar la concordancia entre el método en microplacas y cromatografía de alta performance para la medición de zinc protoporfirina en sangre humana, Lima Noviembre 2025

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la concentración de zinc protoporfirina obtenida por el método en microplacas en las muestras de sangre humana.
- Determinar la concentración de zinc protoporfirina obtenida por el método HPLC en las muestras de sangre humana.
- Cuantificar la diferencia promedio y los límites de acuerdo del 95% entre las mediciones de zinc protoporfirina obtenidas por el método en microplacas y el método HPLC en la misma muestra de sangre humana.
- Calcular el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) para determinar el grado de acuerdo absoluto entre ambos métodos de medición de zinc protoporfirina.
- Determinar si la concordancia entre ambos métodos varía en función de características clínicas y demográficas de los pacientes, como la edad, el sexo y el Diagnóstico/Condición Clínica Relevante.
- Establecer la intercambiabilidad clínica del método en microplacas respecto al método HPLC para la medición de zinc protoporfirina, en función de los límites de acuerdo obtenidos y su relevancia clínica.

1.4 Justificación de la investigación

1.4.1 Justificación teórica

Los resultados de la presente investigación serán de utilidad en la valoración de guías de prácticas clínicas relacionadas al manejo clínico de personas expuestas a la contaminación por plomo. Es de importancia ya que no se aplica el dosaje de BME en la población peruana por falta de equipamiento o técnicas que permitan hacer estas pruebas de manera económica y para grandes cantidades de muestras. De implementarse, mejoraría el flujo de atención de los pacientes afectados por la exposición crónica al plomo, permitiendo un mejor seguimiento en su recuperación y tratamiento.

1.4.2 Justificación metodológica

El estudio contribuirá en ofrecer una metodología alternativa para la medición de este analito y mejorar el alcance de su empleo como biomarcador de efecto.

Para lograr observar las características del desempeño de la prueba se empleará un instrumento de recolección de datos diseñado con la finalidad de registrar la información obtenida al analizar las variables de interés en las que se enfoca la presente investigación y que será de utilidad para ser aplicado en investigaciones similares.

1.4.3 Justificación práctica

La exposición al plomo es un problema de salud pública importante a nivel mundial y nacional siendo una de las prioridades de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del Ministerio de Salud del Perú (MINSA). A nivel nacional el empleo de pruebas de biomarcadores está principalmente enfocada a detectar la exposición más no a identificar cuantitativamente los cambios bioquímicos y metabólicos causados por la exposición al plomo, es decir, el uso de biomarcadores de efecto no es frecuente.

El presente estudio generaría una alternativa más para la medición de este analito, haciéndolo accesible a los laboratorios sin la necesidad de contar con un equipo de HPLC, permitiendo procesar una mayor cantidad de muestras por corrida analítica y eliminando los interferentes presentes en la sangre total. Este trabajo facilitaría la implementación de éste BME en las evaluaciones de poblaciones expuestas a contaminación por plomo complementando la medición del plomo en sangre.

1.5 Delimitaciones de la investigación

1.5.1 Temporal

El presente estudio se realizará durante el mes de noviembre del 2025.

1.5.2 Población o unidad de análisis

Muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA protegidas de la luz.

1.1.1 Espacial

El estudio se realizará en Lima, Perú 2025.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

2.1.1 Internacionales

Jangid, Ambica P., et al. En India en el año 2012 determinaron el impacto de la exposición crónica al plomo en determinados marcadores biológicos. Se reclutaron 250 sujetos, de ambos sexos, con edades comprendidas entre los 20 y los 70 años. Sobre la base de los niveles de plomo en sangre (Blood lead levels en inglés: BLL), los sujetos se clasificaron en cuatro grupos: Grupo A (BLL: 0-10 $\mu\text{g}/\text{dl}$), Grupo B (BLL: 10-20 $\mu\text{g}/\text{dl}$), Grupo C (BLL: 20-30 $\mu\text{g}/\text{dl}$) y Grupo D (BLL: 30-40 $\mu\text{g}/\text{dl}$) con BLLs de $3,60 \pm 2,71 \mu\text{g}/\text{dl}$, $15,21 \pm 2,65 \mu\text{g}/\text{dl}$, $26,82 \pm 2,53 \mu\text{g}/\text{dl}$ y $36,38 \pm 2,83 \mu\text{g}/\text{dl}$, respectivamente. Se observaron cambios significativos en los marcadores biológicos debido a los BLL elevados. También se estudió la relación de los BLL y los marcadores biológicos con características demográficas. Los varones, la población urbana, los no vegetarianos y los fumadores presentaban mayores niveles de plomo en sangre. Se comprobó que la actividad δ -ALAD era significativamente menor con el aumento del BLL ($P < 0,001$), mientras que el nivel de ZPP era significativamente mayor con el aumento del BLL ($P < 0,001$). Además, el BLL mostró una correlación negativa con la δ -ALAD ($r = -0,425$, $P < 0,001$, $N = 250$) y una correlación positiva con la ZPP ($r = 0,669$, $P < 0,001$, $N = 250$). Concluyeron en que la exposición crónica al plomo afecta al equilibrio prooxidante-antioxidante que conduce al estrés oxidativo celular. (9)

Ortega, Fernando et al. en Ecuador en el año 2013 investigaron los niveles de plomo en sangre (PbB) y de zinc protoporfirina (ZPP) en adultos que actualmente viven en comunidades andinas contaminadas por Pb, y compararon los resultados con los niveles de PbB y ZPP de cohortes de adultos expuestos a Pb analizados entre 1996 y 2007. Se midieron las concentraciones de PbB y ZPP en muestras de sangre de 39 adultos. El nivel medio actual de PbB (22,7 $\mu\text{g}/\text{dl}$) fue significativamente inferior a la media (37,9 $\mu\text{g}/\text{dl}$) de la cohorte inicial de 1996. Los niveles de PbB de las cohortes de 1997, 1998, 2003 y 2006 también fueron significativamente más bajos que los niveles del grupo de 1996. Las elevadas relaciones ZPP/heme de 103,3, 128,4 y 134,2 $\mu\text{mol}/\text{mol}$ no fueron significativamente diferentes para los grupos de 2006, 2007 y 2012, lo que indica una exposición crónica al Pb. Mientras que los niveles de ZPP de los trabajadores andinos ecuatorianos que trabajan con Pb se han mantenido elevados, los niveles de PbB

disminuyeron. Concluyeron que los resultados indican que la mayoría de los adultos siguen mostrando evidencias de una exposición prolongada al Pb con efectos adversos en el sistema hematológico, como demuestran los elevados niveles de ZPP/heme durante un periodo de varios años. (10)

Lopes, Vanda, Andrade et al. en el año 2020 en Portugal evaluaron cómo la contaminación por metales en zonas contaminadas se refleja en términos de biomarcadores (BM) de exposición y efecto en subpoblaciones humanas que viven en distintos contextos ambientales no ocupacionales. Así, se estudiaron en cuatro subpoblaciones portuguesas que viven en diferentes zonas de Portugal: i- la exposición de cada miembro de estas subpoblaciones al plomo (Pb) manganeso (Mn) y arsénico (As) mediante la determinación de los niveles del metal en la orina; ii- se evaluaron los cambios bioquímicos, estableciendo los niveles de metabolitos urinarios de la biosíntesis del hemo; iii- la capacidad de las combinaciones de estos BM para predecir el contexto de exposición de cada sujeto, con el fin de desarrollar una herramienta para identificar efectos adversos para la salud en estas poblaciones expuestas al medio ambiente. efectos adversos para la salud en estas poblaciones expuestas al medio ambiente.(11)

En un posterior trabajo en el año 2020 proponen una metodología de multibiomarcadores (BM) para examinar a los sujetos expuestos a la mezcla de Pb, As y Mn y evaluar la gravedad de su exposición/efectos, de forma individual. Se determinaron los niveles urinarios de los metales, del ácido delta-aminolevulínico (ALA) y porfirinas en mineros portugueses y en un grupo de control. La combinación de los niveles urinarios de Pb y As tuvo la mayor capacidad para identificar a los sujetos ocupacionalmente expuestos a esta mezcla en las minas, como se evaluó a través de la Característica Operativa del Receptor (ROC) ($A = 98,2\%$; $p < 0,05$), permitiendo que el 94,2% de los 86 sujetos estudiados fueran identificados correctamente y la generación de una ecuación que indicara la probabilidad de que un sujeto fuera considerado como expuesto a la mezcla de metales. La combinación de ALA y porfirinas urinarias se reveló como la mejor para ser aplicada en la evaluación de sujetos con magnitudes altas, intermedias y bajas de exposición/efectos, con un 95,7% de 46 mineros clasificados correctamente según su subgrupo de gravedad y permitiendo generar ecuaciones, que pueden ser aplicadas en nuevos sujetos. La metodología propuesta mostró un desempeño satisfactorio, evaluando de manera integrada la magnitud de exposición/efectos de los trabajadores expuestos, pudiendo contribuir a mejorar el control de su salud. (5)

2.1.2 Nacionales

Astete J, Cáceres W, et al. en Perú en el año 2009 determinaron los niveles de plomo y otros problemas de salud en menores de 10 años residentes en las comunidades de Quiulacocha y Champamarca, Pasco. El estudio incluyó a todos los niños de ambas comunidades aledañas a relaves mineros. Encontraron que la prevalencia de intoxicación por plomo ($Pb > 10 \mu\text{g/dL}$) fue de 84,7%, la media de plumbemia fue $15,79 \pm 4,85 \mu\text{g/dL}$ (rango: 6,17-34,53 $\mu\text{g/dL}$). La mayoría (55,8%) de los niños de ambas comunidades estaban con desnutrición crónica, 23,0% tenían anemia, y 5,9% tenían retardo mental. Concluyen en que cuatro de cada cinco niños de estas comunidades tienen intoxicación por plomo. (3)

O'Callaghan-Gordo C et al. En el 2021 en un estudio transversal dirigido por el Centro de Salud Ocupacional y Ambiental del Instituto Nacional de Salud de Perú (CENSOPAS-INS), y la colaboración de las federaciones indígenas de las cuencas de los ríos Marañón, Pastaza, Tigre y Corrientes del departamento de Loreto, detectaron niveles de plomo en sangre elevados en comunidades amazónicas fluviales, dichas poblaciones estaban expuestas a contaminación y a actividades relacionadas a la extracción de petróleo. Participaron pobladores de 39 comunidades seleccionados aleatoriamente en dos etapas y fueron visitados entre mayo y junio de 201, con un total de 1047 individuos (309 < 12 años, 738 \geq 12 años). Determinaron el BLL por espectrofotometría de absorción atómica en una cámara de grafito. Encontraron que la media geométrica (IC del 95%) de BLL fue de 4,9 (4,5, 5,4) $\mu\text{g/dL}$ en participantes <12 años y de 5,7 (5,4, 6,0) $\mu\text{g/dL}$ en los participantes de más edad. Ser varón, tener más edad, vivir en las cuencas de los ríos y consumir vísceras de pescados estaba asociado a mayores BLL. También hallaron una leve reducción del BLL si la distancia euclidiana de la residencia y las instalaciones petroleras era mayor. (12)

Childebayeva A. et al. en el 2021 evaluaron la relación entre BLL y ADN metilado. Midió los niveles de plomo en sangre y ADN metilado leucocitario de 305 personas residentes de Cerro de Pasco, Lima, Perú. Hallaron que Los individuos de Cerro de Pasco tenían mayor BLL que los individuos de Lima (p-valor = 2.00E-16). Los varones tenían más BLL que las mujeres (p-valor = 2.36E-04) y que éste disminuyó con la distancia a la mina (p-valor = 0.04). Identificaron la metilación de genes vinculados a la función neurológica, a la unión de iones metálicos y a la función neurológica y el desarrollo.

Demostraron que incluso bajos BLL pueden tener un impacto significativo en el organismo, incluyendo cambios en el ADN. (13)

2.2 Bases teóricas

2.2.1 Biosíntesis del grupo Hemo en mamíferos

La primera enzima, la 5-aminolevulinato sintasa (ALAS), cataliza la conversión de glicina y succinil CoA en una molécula de ácido 5-aminolevulínico (5-ALA), a la que sigue la condensación de dos moléculas de 5-ALA por la 5-aminolevulinato deshidratasa (ALAD) en una molécula de porfobilinógeno (PBG). A continuación, una cascada enzimática convierte cuatro moléculas de PBG en un anillo de tetrapirrol que se somete a descarboxilación, lo que conduce a la formación de protoporfirina IX (PpIX). El hemo se produce cuando la ferroquelatasa inserta un hierro ferroso en la PpIX. (14)

2.2.2 Zinc protoporfirina (ZPP)

Es un metabolito normal que se forma en cantidades mínimas durante la biosíntesis del hemo. El hierro ferroso se quela a la PpIX en una reacción catalizada por la enzima ferroquelatasa. En ausencia de hierro o en caso de un aporte inadecuado de hierro a la reacción enzimática, el zinc es quelado por la misma enzima a la protoporfirina IX, formando la ZPP. Las condiciones que limitan la transferencia de hierro hacia o dentro de la médula ósea o que estimule la síntesis de porfirinas puede conducir potencialmente a una acumulación de ZPP. (15,16) En el caso de la intoxicación por plomo, la presencia del mismo en sangre inhibe la actividad de la hemo sintetasa y en consecuencia incrementa las protoporfirinas en sangre, razón por la cual éste aumento de protoporfirinas ha sido empleado como indicador de intoxicación por plomo. Específicamente, la ZPP se forma como metabolito durante la intoxicación por plomo ya que el plomo interfiere en el rol de la ferroquelatasa en unir la PP con el hierro, uniendo en su lugar el zinc. Éste fenómeno ha llevado al empleo de la presencia de ZPP como marcador de absorción crónica de plomo en múltiples estudios. (17)

2.2.3 Intoxicación por plomo en humanos

El plomo existe de forma natural en cuatro formas isotópicas estables que no se descomponen a escala de la vida humana. El cuerpo no distingue entre isótopos; todos son potencialmente tóxicos para el ser humano. En teoría, el plomo puede entrar en el

cuerpo a través del intestino después de la ingestión, a través del pulmón por inhalación, a través de la inyección directa o a través de la piel. La absorción del plomo parece ocurrir, en parte, a través de los mecanismos desarrollados para los elementos esenciales, en particular calcio y posiblemente el hierro. Estas vías competitivas dan lugar a un aumento de la absorción de plomo cuando la ingesta de minerales en la dieta es inadecuada.

El plomo que entra en el espacio intravascular se adhiere rápidamente a los glóbulos rojos; menos del 3% en una muestra de sangre se encuentra en el plasma. La vida media en la sangre de los adultos es de unas 3 semanas, según los estudios radioisotópicos. La vida media en los niños es menos clara. La salida de la sangre resulta en una mayor acumulación o excreción en los tejidos blandos y duros. La excreción se produce principalmente a través del riñón, aunque también se encuentran pequeñas cantidades en la bilis, el pelo y las uñas. El plomo que permanece en el cuerpo se acumula principalmente en los huesos. En los adultos, más del 90% del plomo que se encuentra en el cuerpo está en el esqueleto; en los niños, alrededor del 65% se encuentra en el esqueleto. (18)

2.2.4 Métodos de medición de Zinc protoporfirina

2.2.4.1 Hematofluorimetría

Se mide la ZPP empleando entre 20-50 uL de sangre total empleando un Hematofluorómetro (HF). Éste es considerado un método sencillo por el que se obtiene el resultado expresado en una razón entre la cantidad de fluorescencia de la ZPP y la cantidad de luz absorbida por la oxihemoglobina. El método tiene por limitaciones el ser afectado por la anemia, el tiempo de almacenamiento de la muestra, la exposición de la misma al calor o a la luz y el tener interferencias por la presencia de materiales fluorescentes en el plasma como la bilirrubina, urobilirrubina, acriflavinas y riboflavinas que pueden llevar a obtener resultados falsamente elevados. (17)

Procedimiento: Se dispensa una capa de sangre en la superficie de un portaobjetos (50 µl de sangre extendidos sobre un cubreobjetos de 25 × 25 mm²), se ilumina con luz de longitud de onda 415 nm y se mide la fluorescencia emitida a 596 nm. (17)

2.2.4.2 Espectrofluorimetría

El procedimiento consta de dos fases:

Extracción: La ZPP se extrae añadiendo 5 ml de una mezcla de acetona/agua (4:1) y mezclando inmediatamente en vórtex. A continuación, la muestra se centrifuga durante 20 min a 3000 rpm y el sobrenadante se analiza con el Espectrofluorómetro.

Medición: El instrumento se ajusta a una longitud de onda de excitación de 410 nm y a una longitud de onda de emisión de 550~750 nm. (17)

2.2.4.3 Cromatografía de alta performance con detección de fluorescencia

Extracción no ácida: Se ha identificado que la extracción que evidencia mejores resultados de precisión y reproducibilidad es la no ácida (2)

- En tubos de 2ml con 200ul de muestra de sangre protegida de la luz se añade 660ul de la solución de extracción y se agita en vórtex por 30s.
- Los tubos se centrifugan 5 min a 14.000 rpm
- La capa sobrenadante se transfiere para el análisis por HPLC.

2.2.5 Método de medición de ZPP en microplacas

2.2.5.1 Método de microplacas

Debido a las limitaciones de la medición Hematofluorimetría por interferencia de otras sustancias fluorescentes en la sangre total y conociendo los procedimientos de extracción que emplea la espectrofluorimetría (17, 23) se empleará un formato de microplacas para la medición de ZPP, dicho formato ha sido empleado para la medición de la concentración del analito en tejidos de ratón (22).

Preparación del estándar de Zinc protoporfirina:

Se debe preparar el estándar cada día de corrida

- Disolver 100ug de protoporfirina IX en 5ml de dimetilformamida (DMF).
- Disolver 250 ug de zinc acetato en 10 mL de DMF en baño maría a 70-75°C para disolver las sales.
- Mezclar ambas soluciones y mantenerlas entre 70-75°C por 3 minutos. Dejar enfriar y filtrar.

- Para verificar la conversión de protoporfirina IX a ZPP se determina con alícuotas expuestas a 408nm para maximizar la respuesta de la protoporfirina y luego a 422nm para maximizar la fluorescencia de la ZPP que emite un pico de 594 nm de fluorescencia. Si solamente hay un compuesto, ambos picos serán idénticos sin importar el punto de excitación. Si hay una diferencia mayor al 2% la mezcla deberá volver a calentarse hasta completar la conversión.
- Añadir 10uL de esta solución de ZPP en DMF a 10mL de acetona-ácido acético (8.2%).
- La absorbancia (A) de esta solución debe estar entre 0.2 a 0.7 a 415-416 nm.
- Cálculo de la concentración de ZPP: $ZPP \text{ por litro} = [A(415nm)/0.211] \times 626$

Donde A es la absorbancia de la solución.

- Se realizarán 8 diluciones seriadas de esta solución en acetona-ácido acético (8.2%) para obtener 8 estándares fluorométricos que cubran el rango de 1 a 10 ng/mL.
- Se tomará 1.5mL de cada dilución en tubos, se le añadirá 10uL de solución salina (40mmol de KCL y 80 mmol de NaCl por litro). Homogenizar por vórtex y centrifugar, se leerán fluorométricamente. Los estándares son estables solo por un día. (24)

Configuración del sistema de lectura

Se configurará el lector de para trabajar en las longitudes de excitación y emisión de 420 y 588 nm respectivamente para generar la curva de calibración para empleando 100 uL del patrón de ZnPP por cada pocillo de la microplaca de ELISA. (22)

Ensayo de estabilidad de la reacción

Se generarán las curvas de fluorescencia para evaluar la estabilidad de la fluorescencia en el tiempo (Tiempos a evaluar: 0, 30, 60, 90 y 120 minutos).

Lavado de glóbulos rojos

Definido el tiempo de lectura óptimo se obtendrá muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA en tubos protegidos de la luz (17). Posteriormente se realizará el lavado de los glóbulos rojos en solución salina isotónica tamponada con fosfato para eliminar posibles interferentes para la medición.

Extracción alcohólica de ZPP

Se tomará 50ul de glóbulos rojos lavados y se diluirán con un 1ml de alcohol a 0°C para posteriormente separar las fases por centrifugación a 13000 g x 2' (22).

Lectura de fluorescencia de ZPP

Para la lectura de fluorescencia se emplearán microplacas de 96 pozos y se dispensará 100uL de etanol como blanco, 100 uL del patrón de ZnPP sintetizado en el laboratorio y 100uL de las extracciones alcohólicas de las muestras por triplicado respectivamente.

Ensayos de precisión

Se evaluará la precisión **intraensayo** replicando el análisis de la muestra problema 6 veces por parte de un operador. Para evaluar la precisión **interensayo** se replicará el ensayo anterior con 3 operadores distintos.

2.3 Formulación de hipótesis

2.3.1 Hipótesis alternativa (H1)

Existe un alto grado de concordancia entre el método en microplacas y cromatografía de alta performance para la medición de zinc protoporfirina en sangre humana, Lima Noviembre 2025.

2.3.2 Hipótesis nula (H0)

No existe un alto grado de concordancia entre el método en microplacas y cromatografía de alta performance para la medición de zinc protoporfirina en sangre humana, Lima Noviembre 2025.

2.3.3 Hipótesis específicas

- HE1: Es posible determinar la concentración de zinc protoporfirina obtenida por el método en microplacas en las muestras de sangre humana.

- HE2: La diferencia promedio y los límites de acuerdo del 95% entre las mediciones de zinc protoporfirina obtenidas por el método en microplacas y el método HPLC en la misma muestra de sangre humana serán menores a 12.2 $\mu\text{mol ZnPP/mol Heme}$
- HE3: El Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) para determinar el grado de acuerdo absoluto entre ambos métodos de medición de zinc protoporfirina será bueno.
- HE4: La concordancia entre ambos métodos variará en función de características clínicas y demográficas de los pacientes.
- HE5: Se establecerá la intercambiabilidad clínica del método en microplacas respecto al método HPLC para la medición de zinc protoporfirina, en función de los límites de acuerdo obtenidos y su relevancia clínica.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

2.4 Método de la investigación

La presente investigación tendrá una Metodología Hipotético deductiva debido a que se formulan hipótesis y se contrastan con los resultados obtenidos en la realidad. El problema de estudio está delimitado, es concreto y las preguntas de investigación son específicas, centradas en fenómenos medibles partiendo de una pregunta clara que requiere una respuesta empírica. (19)

2.5 Enfoque de la investigación:

El trabajo utilizará un Enfoque Cuantitativo, ya que los parámetros a evaluar para la concordancia son cuantificables en escala categórica o numérica y la interpretación de los resultados se basará en el análisis estadístico de los mismos.

2.6 Tipo de investigación:

El presente trabajo es una investigación de tipo aplicada ya que se busca encontrar soluciones directas y efectivas a problemas concretos y actuales que se encuentran en la realidad. Es a su vez observacional ya que no se manipula ninguna de las variables y solo se registran sus comportamientos para llegar a conclusiones. (19)

2.7 Diseño de la investigación:

El trabajo tiene un diseño no experimental por lo que no se manipularán deliberadamente las variables sino que se hará la observación de los fenómenos tal como se dan en su contexto natural, de corte transversal puesto que se recolectan los datos en un solo momento, busca describir variables y analizar su interrelación en un punto específico y prospectivo ya que el registro de las observaciones se irá dando a medida que se vayan desarrollando las actividades (19)

2.8 Población, muestra y muestreo

2.8.1 Población

Se emplearán 80 muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA protegidas de la luz de pacientes atendidos en un hospital de Lima, distrito de Jesús María,

procedentes de consulta externa durante el mes de noviembre del 2015 con solicitud de hemograma en el servicio de Hematología.

2.8.2 Muestra

Diariamente en promedio se procesan un total de 290 hemogramas provenientes de consulta externa en el establecimiento de salud de donde se obtendrán las muestras para el desarrollo de la presente investigación. Debido a que para trabajar con el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) de 0.80 con un 95% de confianza y 80% de poder, y con dos mediciones por muestra, se requieren aproximadamente 20 a 50 muestras (20) y en el caso de los Gráficos de Bland-Altman, para estimar de manera robusta la media de las diferencias y los límites de acuerdo del 95% es recomendable un mínimo de 60 a 70 pacientes (21) se trabajará 80 muestras que cumplan con los criterios de inclusión seleccionado 8 muestras en 10 días.

2.8.3 Muestreo

Se empleará un muestreo no probabilístico por conveniencia seleccionando diariamente 8 muestras al azar que cumplan con los criterios de elegibilidad en cada uno de los 10 días. Siendo los criterios de elegibilidad los siguientes:

2.8.3.1 Criterios de inclusión

- Muestras de los pacientes que asistan al hospital por consulta externa.
- Muestras que fueron protegidas de la luz con papel aluminio desde la toma de muestra. (17)
- Muestras que tengan un tiempo máximo de recolección de 4 horas. (17)

2.8.3.2 Criterios de exclusión

- Muestras con volumen insuficiente.
- Muestras hemolizadas.
- Muestras coaguladas.
- Muestras lipémicas.
- Muestras ictericas. (17)

2.9 Variables y operacionalización

2.9.1 Variable Principal / Desenlace:

- Grado de concordancia entre la concentración de ZPP medida por el método en microplacas y la concentración de ZPP medida por el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC).

2.9.2 Variable exposición y/o covariables:

- Concentración de ZPP medida por el método en microplacas.
- Concentración de ZPP medida por el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

2.9.3 Variables Intervinientes:

- Edad
- Sexo
- Diagnóstico/Condición Clínica Relevante
- Concentración de Hemoglobina (Hb)

2.9.4 Operacionalización de variables

Variable dependiente (outcome o desenlace)	Definición Conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala de medición	Escala valorativa (Niveles o rangos)
Grado de concordancia	Medida en que dos o más mediciones, obtenidas por diferentes observadores, instrumentos o métodos, arrojan resultados similares o idénticos cuando se aplican a la misma característica o fenómeno en los mismos sujetos.(21)	Obtenido del análisis estadístico	Media de las Diferencias (Mean Difference)	Diferencia promedio entre las mediciones del método en microplacas y el método HPLC.	De Razón	Cero absoluto: ausencia total de diferencia.
			Coefficiente de Correlación Intraclase (CCI)	CCI(2,1) o CCI(A,1) - Dos vías, aleatorio, acuerdo absoluto (Two-Way Random, Absolute Agreement)	De Razón	Valor del CCI Nivel de Concordancia / Fiabilidad ≤0.50 /Pobre 0.50–0.75/ Moderada 0.75–0.90/ Buena >0.90 /Excelente
			Bland-Altman	Límites de Acuerdo del 95% (95% Limits of Agreement - LoA)	De Razón	± 12.2 μmol ZnPP/mol Heme (7)
Variable independiente (exposición)	Definición Conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala de medición	Escala valorativa (Niveles o rangos)

Concentración de ZPP medida por el método en microplacas	Valor numérico obtenido a partir de una muestra de sangre humana procesada y analizada utilizando el sistema de lectura de la fluorescencia en el lector de microplacas.	Obtenido del instrumento	unidimensional	Resultado de la Prueba de ZPP medida por el método en microplacas	Cuantitativa Continua de Razón	$\mu\text{mol ZnPP/mol Heme}$
Variable independiente secundaria (Covariable)	Definición Conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala de medición	Escala valorativa (Niveles o rangos)
Concentración de ZPP medida por el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC)	Valor numérico obtenido por el análisis gold estándar para la determinación de ZPP en una muestra de sangre humana utilizando un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Performance (HPLC) de acuerdo con el protocolo estandarizado del laboratorio.	Obtenido del instrumento	unidimensional	Resultado de la Prueba de ZPP medida por el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC)	Cuantitativa Continua de Razón	$\mu\text{mol ZnPP/mol Heme}$

Variables intervenientes	Definición Conceptual	Definición operacional	Dimensión	Indicador	Escala de medición	Escala valorativa (Niveles o rangos)
Edad	Medida del tiempo transcurrido desde el nacimiento de un ser vivo, expresada comúnmente en años.	Obtenido del instrumento	Rango de edad	Años cumplidos al momento del estudio	Cualitativa Ordinal	0 a 5 años 6 a 11 años 12 a 18 años 19 a 26 años 27 a 59 años 60 años a más
Sexo	Característica demográfica que distingue a los seres humanos y a otros organismos en masculino y femenino	Obtenido del instrumento	Unidimensional	Categoría taxonómica que clasifica una familia de animales u organismo.	Cualitativa Nominal	Masculino Femenino
Diagnóstico/Condición Clínica Relevante	Presencia de enfermedades, síndromes o estados fisiológicos específicos en el paciente que pueden influir en los niveles de zinc protoporfirina o en la fiabilidad de sus mediciones.	Obtenido del instrumento	Características clínicas	Estado de salud o condición que presenta al momento de la toma de muestra	Cualitativa Nominal	Clasificación Internacional de Enfermedades (CIE)

Concentración de Hemoglobina (Hb)	Valor numérico obtenido en gramos por decilitro (g/dL) de sangre total, medido mediante un analizador hematológico automatizado estándar de laboratorio.	Obtenido del instrumento	Unidimensional	Valor de concentración de hemoglobina.	Cuantitativa Continua de Razón	Gramos por decilitro (g/dL)
-----------------------------------	--	--------------------------	----------------	--	--------------------------------	-----------------------------

2.10 Técnicas e instrumentos de recolección de datos

2.10.1 Técnicas

Se utilizará una técnica observacional ya que el objetivo principal es observar, recolectar los datos tal como ocurren y describir las relaciones entre variables tal como se presenten registrando los hallazgos sin manipular ni intervenir en las variables.

2.10.1.1 Procedimiento:

a. Ensayo de extracción alcohólica

- Lavado de hematíes
- Lisis de hematíes en etanol a 0°C (21)
- Centrifugación y separación en fases

b. Preparación de patrones de trabajo

- Síntesis de ZnPP en el laboratorio por precipitación de Zn acetato y protoporfirina IX.

c. Configuración del sistema de detección

- Configuración del equipo en los rangos de excitación y de emisión para la lectura de ZnPP.
- Generación de curva de calibración empleando el patrón de ZnPP.
- Espectro de fluorescencia para ZnPP en extracción alcohólica.

d. Ensayo de precisión

- Evaluación de la precisión inter ensayo.
- Evaluación de la precisión intra ensayo.

e. Ensayo de estabilidad de la reacción

- Ensayo de estabilidad de fluorescencia de ZnPP en el tiempo.

Análisis por HPLC

Las muestras serán analizadas por el método de HPLC para obtener las concentraciones de ZPP en un Instituto de Lima.

2.10.2 Descripción de instrumentos

Para el presente estudio se elaborará una ficha de recolección de datos para obtener la información correspondiente de acuerdo a los objetivos planteados.

El instrumento planteado incluirá la siguiente información:

- Edad
- Sexo
- Diagnóstico/Condición Clínica Relevante
- Concentración de Hemoglobina (Hb)
- Concentración de ZPP medida por el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC)

2.10.3 Validación

Ya que el presente estudio empleará una ficha de recolección de datos que tiene por finalidad organizar y estandarizar la entrada de información ya existente y no está diseñadas para inferir o medir un constructo no se requiere la validación del instrumento. La ficha está diseñada en base a lo requerido según las bases teóricas del presente proyecto, no se requiere mayor registro de información.

2.10.4 Confiabilidad

Los test de confiabilidad se aplican a instrumentos que miden constructos que no son directamente observables para evaluar si esos ítems son consistentes entre sí, si la medición es estable a lo largo del tiempo o entre diferentes evaluadores. En el presente caso solo será empleada para registrar información ya existente sin llegar a hacer inferencias por lo que no se requiere hacer alguna prueba de confiabilidad.

2.11 Plan de procesamiento y análisis de datos

Se hará un análisis general de las características de la muestra, es decir la edad, sexo, concentración de hemoglobina, diagnóstico y los valores de ZPP obtenidos por ambas metodologías. En base a esta información se hará el análisis estadístico para evaluar la concordancia incluyendo el Coeficiente de Correlación intraclase (ICC), ya que ambas técnicas miden la misma propiedad en una escala continua y Gráficos de Bland-Altman

para visualizar la diferencia entre las mediciones en función de su promedio, identificar sesgos sistemáticos y límites de acuerdo.

2.12 Aspectos éticos

El proyecto será evaluado por el comité de ética de la Universidad Norbert Wiener. Se solicitará la autorización del departamento de Patología Clínica y del servicio de Hematología del establecimiento de salud para el uso de las muestras ya procesadas. La investigación no involucra directamente a los pacientes, por lo que no se requiere el empleo de un consentimiento informado. Los datos e identificación no serán divulgados y solo los mantendrá el investigador principal, se identificará a cada paciente con un código para proteger su identidad y únicamente se trabajará con la muestra con fines analíticos del estudio. Ya que se trabajará con muestras ya procesadas para la prueba de hemograma, se garantiza que no se perjudicará al paciente ya que dichas muestras, por protocolo de trabajo del servicio, serían descartadas. No existe un riesgo adicional para el paciente ni perjuicio por el dosaje de ZPP debido a que es un analito normalmente presente en la sangre y sus niveles de concentración no representan valores críticos que puedan significar un riesgo de daño en la salud o integridad física del paciente.

CAPÍTULO IV: ASPECTOS ADMINISTRATIVOS

2.13 Cronograma de actividades

Actividades/Meses	2025																		2026		
	Junio	Julio	Agosto	Noviembre															Diciembre	Enero	
				1	2	3	4	5	6	7	8	9-18	19	20	21	22	23	24			
Selección y redacción del tema a investigar	x																				
Presentación y aprobación del proyecto		x	x																		
Levantamiento de observaciones			x																		
Solicitud de permisos al Departamento de Patología			x																		
Preparación de reactivos y patrones de trabajo				x																	
Configuración del sistema de detección				x																	
Generación de curva de calibración					x																
Ensayo de extracción alcohólica					x	x															
Ensayo de estabilidad de la reacción							x	x	x	x	x										
Desarrollo del método de microplacas												x									
Desarrollo del análisis por HPLC												x									
Análisis de datos													x	x	x						
Informe de resultados															x	x	x				

Revisión del informe																		x	x			
Presentación de la investigación																					x	
Sustentación del trabajo																						x

2.14 Presupuesto

DESCRIPCIÓN	CANTIDAD	COSTO UNITARIO (S/.)	COSTO TOTAL (S/.)
MATERIALES DE ESCRITORIO			
Papel A-4	2 Millar	12.00	24.00
CD	2	1.50	3.00
Folders	6	1.50	9.00
Sobre Manila	4	1.00	4.00
Bolígrafos	12	2.00	12.00
Fotocopias	1 Millar	0.10	100.00
Tinta de impresora	3	50.00	150.00
Anillados	3	7.00	21.00
SUBTOTAL			323.00
SERVICIOS TERCEROS			
Internet	Mensual	80.00	80.00
Asistente	Mensual	1130.00	1130.00
SUBTOTAL			1210.00
TRANSPORTE			
Local	60	4.00	240.00
SUBTOTAL			240.00
MATERIAL BÁSICO DE LABORATORIO			
Zn acetato 50g	1	565.46	565.46
Protoporfirina IX 50 mg	1	900.00	900.00
DMSO(Dimetilsulfoxido) 99.9 %	1	110.00	110.00
Solución salina isotónica 1L	3	5.00	15.00
Alcohol etílico 96 grados	3	8.00	24.00
Microplacas de 96 pozos (10 u)	1	425.62	425.62
SUBTOTAL			2039.46
TOTAL			3812.46

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Intoxicación por plomo. noviembre de 2021; Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/lead-poisoning-and-health>
2. Santos NR, Bandeira M de J, Bah HAF, Rodrigues JLG, Cardoso MS, Rocha AR, et al. Zinc-protoporphyrin determination by HPLC with fluorescence detection as a biomarker of lead effect in artisanal pottery workers. *Biomed Chromatogr BMC*. febrero de 2021;35(2):e4983-e4983.
3. Astete J, Cáceres W, Gastañaga M del C, Lucero M, Sabastizagal I, Oblitas T, et al. Intoxicación por plomo y otros problemas de salud en niños de poblaciones aledañas a relaves mineros. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2009;26(1):15-9.
4. Sakai T. Biomarkers of lead exposure. *Ind Health*. 2000;38(2):127-42.
5. Lopes de Andrade V, Serrazina D, Mateus ML, Batoréu C, Aschner M, Marreilha dos Santos AP. Multibiomarker approach to assess the magnitude of occupational exposure and effects induced by a mixture of metals. *Toxicol Appl Pharmacol*. octubre de 2021;429(August):115684-115684.
6. MINSA. Resolución Ministerial N°400-2017/MINSA.
7. Schliemann A, Homann C, Hennig G, Lang A, Holdt LM, Vogeser M, et al. Non-Invasive Zinc Protoporphyrin Screening Offers Opportunities for Secondary Prevention of Iron Deficiency in Blood Donors. *Res Artic Transfus Med Hemother*. 2023;50:303-12.
8. Janousek SJ, Rosa L, Janousek S, Jirova D, Kejlova K. Oxidative stress may modify zinc protoporphyrin/heme ratio in hematofluorometry. *Int J Lab Hematol*. febrero de 2010;32(1 PART.2):40-9.
9. Jangid AP, John PJ, Yadav D, Mishra S, Sharma P. Impact of Chronic Lead Exposure on Selected Biological Markers. *Indian J Clin Biochem*. marzo de 2012;27(1):83-83.
10. Ortega F, Counter SA, Buchanan LH, Coronel Parra AM, Collaguaso MA, Jacobs AB, et al. Declining blood lead and zinc protoporphyrin levels in Ecuadorian Andean children. *Clin Biochem*. septiembre de 2013;46(13-14):1233-8.
11. Lopes V, Andrade D, Cota M, Serrazina D, Luisa M, Aschner M, et al. Metal environmental contamination within different human exposure context- specific and non-specific biomarkers. *Toxicol Lett*. 2020;324(October 2019):46-53.
12. O'Callaghan-Gordo C, Rosales J, Lizárraga P, Barclay F, Okamoto T, Papoulias DM, et al. Blood lead levels in indigenous peoples living close to oil extraction areas in the Peruvian Amazon. *Environ Int*. septiembre de 2021;154:106639-106639.
13. Childebayeva A, Goodrich JM, Chesterman N, Leon-Velarde F, Rivera-Ch M, Kiyamu M, et al. Blood lead levels in Peruvian adults are associated with proximity to mining and DNA methylation. *Environ Int* [Internet]. octubre de 2021;155. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33940396/>
14. Fotinos N, Campo MA, Popowycz F, Gurny R, Lange N. 5-Aminolevulinic Acid Derivatives in Photomedicine: Characteristics, Application and Perspectives. *Photochem Photobiol*. julio de 2006;82(4):994-1015.

15. Braun J. Erythrocyte zinc protoporphyrin. *Kidney Int.* marzo de 1999;55(69):S57-60.
16. Labbé RF, Vreman HJ, Stevenson DK. Zinc protoporphyrin: A metabolite with a mission. *Clin Chem.* diciembre de 1999;45(12):2060-72.
17. Roh YM, Kim K, Kim H. Zinc protoporphyrin IX concentrations between normal adults and the lead-exposed workers measured by HPLC, spectrofluorometer, and hematofluorometer. *Ind Health.* octubre de 2000;38(4):372-9.
18. Markowitz M. Lead Poisoning. *Pediatr Rev.* octubre de 2000;21(10):327-35.
19. Hernández Sampieri R, Fernández Collado C, Baptista Lucio P. Metodología de la investigación [Internet]. McGraw Hill España; 2014 [citado 28 de junio de 2025]. Disponible en: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=775008>
20. Koo TK, Li MY. A Guideline of Selecting and Reporting Intraclass Correlation Coefficients for Reliability Research. *J Chiropr Med.* junio de 2016;15(2):155-63.
21. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement - PubMed [Internet]. [citado 29 de junio de 2025]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2868172/>
22. Pan R, Yu S, Zhang H, Timmins GS, Weaver J, Yang Y, et al. Endogenous zinc protoporphyrin formation critically contributes to hemorrhagic stroke-induced brain damage. *J Cereb Blood Flow Metab* [Internet]. 2021;41(12):3232–47. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1177/0271678X211028475>
23. Schifman RB, Finley PR. Measurement of near-normal concentrations of erythrocyte protoporphyrin with the hematofluorometer: influence of plasma on “front-surface illumination” assay. *Clin Chem* [Internet]. 1981;27(1):153–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/clinchem/27.1.153>
24. Chisolm JJ Jr, Brown DH. Micromethod for zinc protoporphyrin in erythrocytes: including new data on the absorptivity of zinc protoporphyrin and new observations in neonates and sickle cell disease. *Biochem Med* [Internet]. 1979;22(2):214–37. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2944\(79\)90008-5](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2944(79)90008-5)

ANEXOS

ANEXO 1: MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO DEL PROYECTO: “Concordancia entre el método en microplacas y cromatografía de alta performance para la medición de zinc protoporfirina en sangre humana, Lima Noviembre 2025”

AUTOR(A): Cabanillas Espinoza, Carmen Elizabeth

PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN	OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA
<p>General: ¿Existe un grado de concordancia aceptable entre el método en microplacas y la cromatografía de alta performance (HPLC) para la medición de zinc protoporfirina en muestras de sangre humana , Lima Noviembre 2025?</p>	<p>General: Evaluar la concordancia entre el método en microplacas y cromatografía de alta performance para la medición de zinc protoporfirina en sangre humana, Lima Noviembre 2025</p>	<p>Hipótesis alternativa (H1): Existe un grado de concordancia aceptable entre el método en microplacas y cromatografía de alta performance para la medición de zinc protoporfirina en sangre humana, Lima Noviembre 2025.</p> <p>Hipótesis nula (H0): No existe un grado de concordancia aceptable entre el método en microplacas y cromatografía de alta performance para la medición de zinc protoporfirina en sangre humana, Lima Noviembre 2025.</p>	<p>Variable Principal / Desenlace: Grado de concordancia entre la concentración de ZPP medida por el método en microplacas y la concentración de ZPP medida por el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC).</p>	<p>Método de la investigación: Hipotético deductivo.</p> <p>Enfoque de la investigación: Enfoque cuantitativo.</p> <p>Tipo de investigación: Investigación de tipo Aplicado observacional, de corte transversal, prospectivo.</p> <p>Diseño de la investigación: Investigación no Experimental.</p> <p>Instrumento</p>

<p>Específico:</p> <p>¿Cuál es la concentración de zinc protoporfirina obtenida por el método método en microplacas en las muestras de sangre humana?</p> <p>¿Cuál es la concentración de zinc protoporfirina obtenida por el método HPLC en las muestras de sangre humana?</p> <p>¿Cuál es la diferencia promedio y cuáles son los límites de acuerdo del 95% entre las mediciones de zinc protoporfirina obtenidas por el método en microplacas y el método HPLC en la misma muestra de sangre humana?</p> <p>¿Cuál es el valor del Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) para las mediciones de zinc protoporfirina obtenidas por ambos métodos?</p> <p>¿La concordancia entre el método en microplacas y el método HPLC para la medición de zinc protoporfirina varía la edad, el sexo y el</p>	<p>Específico:</p> <p>Determinar la concentración de zinc protoporfirina obtenida por el método método en microplacas en las muestras de sangre humana.</p> <p>Determinar la concentración de zinc protoporfirina obtenida por el método HPLC en las muestras de sangre humana.</p> <p>Cuantificar la diferencia promedio y los límites de acuerdo del 95% entre las mediciones de zinc protoporfirina obtenidas por el método en microplacas y el método HPLC en la misma muestra de sangre humana.</p> <p>Calcular el Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) para determinar el grado de acuerdo absoluto entre ambos métodos de medición de zinc protoporfirina.</p> <p>Determinar si la concordancia entre ambos métodos varía en función de características clínicas y demográficas de los pacientes, como la edad, el sexo</p>	<p>Hipótesis específicas</p> <p>HE1: Es posible determinar la concentración de zinc protoporfirina obtenida por el método en microplacas en las muestras de sangre humana.</p> <p>HE2: La diferencia promedio y los límites de acuerdo del 95% entre las mediciones de zinc protoporfirina obtenidas por el método en microplacas y el método HPLC en la misma muestra de sangre humana serán menores a 12.2 $\mu\text{mol ZnPP/mol Heme}$</p> <p>HE3: El Coeficiente de Correlación Intraclase (CCI) para determinar el grado de acuerdo absoluto entre ambos métodos de medición de zinc protoporfirina será bueno.</p> <p>HE4: La concordancia entre ambos métodos variará en función de características clínicas y demográficas de los pacientes.</p> <p>HE5: Se establecerá la intercambiabilidad clínica del método en microplacas respecto al método HPLC para la medición de zinc protoporfirina, en función de los límites de acuerdo obtenidos y su relevancia clínica.</p>	<p>Variable exposición y/o covariables: Concentración de ZPP medida por el método en microplacas.</p> <p>Concentración de ZPP medida por el método de cromatografía líquida de alta performance (HPLC)</p> <p>Variables Intervinientes:</p> <p>Edad</p> <p>Sexo</p> <p>Diagnóstico/Condición Clínica Relevante</p> <p>Concentración de Hemoglobina (Hb)</p>	<p>Ficha de recolección de datos.</p> <p>Procesamiento y análisis de Datos</p> <p>Población: Muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA protegidas de la luz.</p> <p>Muestra: Se utilizarán 80 muestras de sangre venosa anticoagulada con EDTA protegidas de la luz.</p> <p>Técnicas de procesamiento de datos:</p> <p>Técnica observacional.</p> <p>Coeficiente de Correlación intraclase (ICC).</p> <p>Gráficos de Bland-Altman</p>
--	--	---	---	--

<p>Diagnóstico/Condición Clínica Relevante de los pacientes?</p> <p>¿Son los resultados de la medición de zinc protoporfirina obtenidos por el método en microplacas clínicamente intercambiables con los obtenidos por el método HPLC?</p>	<p>y el Diagnóstico/Condición Clínica Relevante.</p> <p>Establecer la intercambiabilidad clínica del método en microplacas respecto al método HPLC para la medición de zinc protoporfirina, en función de los límites de acuerdo obtenidos y su relevancia clínica.</p>			
---	---	--	--	--

ANEXO 2: INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Código:

N.º de ficha:

Operador:

1. Edad (años): ()

2. Sexo: Masculino () Femenino ()

3. Diagnóstico/Condición Clínica Relevante: CIE ()

4. Concentración de hemoglobina: () g/L

5. Concentración de ZPP medida por HPLC: () $\mu\text{mol ZnPP/mol Heme}$

6. Método de microplacas

Primera medición	Segunda medición




10% Similitud general

El total combinado de todas las coincidencias, incluidas las fuentes superpuestas, para ca...

Filtrado desde el informe

- ▶ Bibliografía
- ▶ Texto citado
- ▶ Texto mencionado
- ▶ Coincidencias menores (menos de 10 palabras)

Fuentes principales

- 10%  Fuentes de Internet
- 2%  Publicaciones
- 6%  Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Marcas de integridad

N.º de alertas de integridad para revisión

No se han detectado manipulaciones de texto sospechosas.

Los algoritmos de nuestro sistema analizan un documento en profundidad para buscar inconsistencias que permitirían distinguirlo de una entrega normal. Si advertimos algo extraño, lo marcamos como una alerta para que pueda revisarlo.

Una marca de alerta no es necesariamente un indicador de problemas. Sin embargo, recomendamos que preste atención y la revise.

Fuentes principales

- 10% Fuentes de Internet
- 2% Publicaciones
- 6% Trabajos entregados (trabajos del estudiante)

Fuentes principales

Las fuentes con el mayor número de coincidencias dentro de la entrega. Las fuentes superpuestas no se mostrarán.

1	Internet	repositorio.uwiener.edu.pe	4%
2	Trabajos entregados	Universidad Científica del Sur on 2018-07-12	<1%
3	Internet	link.springer.com	<1%
4	Internet	repositorio.ucv.edu.pe	<1%
5	Internet	www.coursehero.com	<1%
6	Internet	www.dane.gov.co	<1%
7	Internet	repositorio.uncp.edu.pe	<1%
8	Trabajos entregados	Universidad Cesar Vallejo on 2022-08-19	<1%
9	Internet	docs.bvsalud.org	<1%
10	Internet	hdl.handle.net	<1%
11	Internet	1library.co	<1%