



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS Y  
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD

TITULO:

**“Cuantificación de las proteínas de choque térmico en recién nacidos a término sanos y prematuros con sepsis”**

Tesis que para optar por el  
grado de Maestría en Ciencias Médicas

PRESENTA:

**Arturo Alejandro Canul Euan**

TUTOR PRINCIPAL:

**M. en C. Héctor Flores Herrera**

Instituto Nacional de Perinatología “*Isidro Espinosa de los Reyes*”

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Ricardo Figueroa Damián, Instituto Nacional de Perinatología “*Isidro Espinosa de los Reyes*”

Dra. Leonor Patricia Saltigeral Tigeral, Instituto Nacional de Pediatría

Ciudad de México, enero de 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
PROGRAMA DE MESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
MÉDICAS Y ODONTOLÓGICA Y DE LA SALUD Y LA  
ENTIDAD ACADÉMICA INSTITUTO NACIONAL DE  
PERINATOLOGÍA

---

Ciudad de México a 7 de octubre de 2019

**Dra. Teresa Imelda Fortoul van der Goes**

Coordinadora del programa de Maestría y Doctorado  
en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud.

PRESENTE:

Los abajo firmantes dictaminamos que la TESIS  
titulada "Cuantificación de las proteínas de choque térmico en recién nacidos a  
término sanos y prematuros con sepsis".

Que presenta Arturo Alejandro Canul Euan con número de cuenta 516222901 para  
obtener el grado de Maestro en Ciencias Médicas

Informamos que después de haber revisado el trabajo consideramos que reúne las  
características de calidad académica que se requieren por lo que AUTORIZAMOS  
para que el alumno prosiga con los trámites correspondientes que le permitirán la  
presentación y defensa del examen correspondiente.

M. en C. Héctor Flores Herrera  
Director de Tesis

Dr. Ricardo Figueroa Damián  
Responsable de la entidad

Arturo Alejandro Canul Euan  
alumno

## INDICE GENERAL

	<i>Página</i>
1.0 INTRODUCCIÓN .....	9
2.0 ANTECEDENTES .....	11
2.1 <i>Datos epidemiológicos de la sepsis neonatal</i> .....	11
2.2 <i>Clasificación</i> .....	11
2.3 <i>Manifestaciones clínicas</i> .....	12
2.4 <i>Marcadores para el diagnóstico de sepsis neonatal</i> .....	13
2.5 <i>Proteínas de choque térmico</i> .....	14
2.6 <i>Relación de las HSP y la respuesta inflamatoria</i> .....	17
3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	21
4.0 JUSTIFICACION .....	22
5.0 OBJETIVOS E HIPOTESIS .....	24
6.0 MATERIAL Y MÉTODOS .....	25
6.1 <i>Universo de las pacientes de estudio</i> .....	25
6.1.1 <i>Criterios de inclusión</i> .....	25
6.1.2 <i>Criterios de exclusión</i> .....	25
6.1.3 <i>Criterios de eliminación</i> .....	25
6.2 <i>Variables de estudio</i> .....	25
6.3 <i>Procedimiento</i> .....	26
6.4 <i>Obtención de las muestras</i> .....	27
6.5 <i>Cuantificación de la HSP mediante el método de ELISA</i> .....	27

	<i>Página</i>
6.6 <i>Análisis estadístico</i> .....	28
6.7 <i>Aspectos éticos</i> .....	28
7.0 RESULTADOS .....	30
7.1 <i>Datos epidemiológicos</i> .....	30
7.2 <i>Cuantificación de las HSP</i> .....	33
7.3 <i>Cuantificación de las HSP y el resultado del hemocultivo en los recién nacidos prematuros</i> .....	34
7.3.1 <i>cuantificación de las HSP-27 con el resultado del hemocultivo</i> .....	34
7.3.2 <i>cuantificación de las HSP-60 con el resultado del hemocultivo</i> .....	34
7.3.3 <i>cuantificación de las HSP-70 con el resultado del hemocultivo</i> .....	35
10.0 PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE ESTUDIO .....	41
11.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
ANEXO 1 Carta Institucional .....	48
ANEXO 2 Consentimiento informado .....	50

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

*Página*

### TABLAS

1. Marcadores de laboratorio en el diagnóstico de sepsis neonatal temprana .....	14
2. Rango de la curva estándar de las proteínas de choque térmico .....	28
3. Características maternas y neonatales .....	30
4. Diagnóstico clínico de los recién nacidos prematuros con sepsis .....	32
5. Cuantificación de las HSP en el suero de los neonatos .....	33
6. Hemocultivo y valores de las HSP .....	34

### FIGURAS

1. Estructura de las HSP pequeñas .....	15
2. Estructura de las HSP grandes .....	16
3. Interacción de las HSP y la respuesta inflamatoria .....	38

## **AGRADECIMIENTOS**

### **APOYOS Y RECONOCIMIENTOS**

El presente trabajo se realizó en el departamento de Inmunobioquímica del Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes” INPerIER bajo la dirección del M. en C. Héctor Flores Herrera.

El desarrollo del presente proyecto de investigación fue realizado con fondos federales mediante su registro 2017-2-82 (otorgado a HFH) y por la aprobación del comité de Ética en Investigación (registro 212250-3210101).

La obtención de las muestras de sangre de los neonatos fueron tomadas en la unidad de cuidados intermedios del INPerIER. Arturo Alejandro Canul Euan alumno del programa de Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud, UNAM (516222901) fue becario del programa de CONACyT.

## RESUMEN

*Introducción:* A nivel mundial la sepsis neonatal es una de las primeras causas morbilidad y mortalidad. Las proteínas de choque térmico (HSP) han sido asociadas como moléculas reguladoras de la respuesta inflamatoria. El principal objetivo del presente estudio fue determinar la concentración de la HSP-27, -60 y -70 en el suero de recién nacidos a término sanos y recién nacidos prematuros con sepsis.

*Material y Métodos:* Se tomaron 500 µl de sangre de recién nacidos a término sanos (n=23), y recién nacidos prematuros con sepsis (n=9). Las muestras fueron centrifugadas y se recuperó el plasma el cual se almaceno a -70°C. La cuantificación de las Hsp-27, -60 y -70 se realizó mediante el ensayo de ELISA como ha sido reportado previamente por nuestro grupo de investigación.

*Resultados:* La edad gestacional de los recién nacidos a término sanos fue de  $38.5 \pm 1.1$  semanas y en los recién nacidos prematuros con sepsis  $31.1 \pm 2.9$  semanas ( $p \leq 0.001$ ). El peso de los recién nacidos a término sanos fue de  $2,970 \pm 441.0$  gramos (g) y en los recién nacidos prematuros con sepsis  $1300 \pm 709.5$  g ( $p = 0.006$ ). El análisis microbiológico realizado en la sangre de los recién nacidos prematuros con sepsis se reportó que el 33.3% (3/9) el crecimiento de microorganismos como: *E. coli* (1 caso, M1), *E. epidermidis* (1 caso, M5) y *S. dysgalactiae* (1 caso, M7). En el 66.7% de las muestras analizadas no se aislaron bacterias. El 22.2% de los casos, las pacientes desarrollaron datos clínicos de corioamnionitis (M1, y M3), en tanto que la ruptura de las membranas fetales se presentó en el 44.4% (M2, M3, M8, y M9). En el 11.1% se presentó simultáneamente datos clínicos de corioamnionitis y ruptura prematura de las membranas fetales (M3). De las pacientes en las que sus recién nacidos desarrollaron datos clínicos de sepsis, el 27.2% presentaron datos clínicos de preeclampsia (M5, M8, y M9) de las cuales el 11.1% tuvieron preeclampsia severa (M7) y el recién nacido presento restricción del crecimiento intrauterino. La concentración de la HSP-27 en los recién nacidos a término sanos fue de  $0.045 \pm 0.024$  pg/mL la cual disminuyo 2.4-veces en los neonatos con sepsis ( $0.019 \pm 0.006$  pg/mL;  $p = 0.004$ ). La concentración de la HSP-60 en los recién nacidos a término sanos fue de  $13.69 \pm 5.3$  pg/mL la cual aumento 1.8-veces en los recién nacidos prematuros con sepsis ( $24.7 \pm 3.0$  pg/mL;  $p \leq 0.001$ ). La concentración de la HSP-70 en los recién nacidos a término sanos fue de  $4.03 \pm 0.89$  pg/mL la cual aumento 2.0-veces en los recién nacidos prematuros con sepsis ( $7.9 \pm 0.62$  pg/mL;  $p \leq 0.001$ ).

*Conclusiones:* Estos resultados sugieren que las HSP pudieran ayudar en la clínica para la identificación de neonatos con sospecha de sepsis.

*Palabras clave:* Sepsis neonatal; proteínas de choque térmico.

## ABSTRACT

*Introduction:* Worldwide sepsis in neonates is one of the leading causes of neonatal morbidity and mortality. Heat shock proteins (HSP) have been associated as regulatory molecules of the inflammatory response. Hsp-27 has been associated as an anti-inflammatory molecule, our results confirm this role since in neonates with labor and in cases of sepsis we find a significant decrease. While Hsp-60 and -70 are associated with the pro-inflammatory response. In the cases of neonates with labor and with sepsis both proteins increased significantly with respect to neonates without labor. The main objective of the present study was to determine the concentration of Hsp-27, -60 and -70 in the serum of healthy term infants and neonates with clinical evidence of sepsis.

*Material and methods:* 500  $\mu$ l of blood were taken from healthy term infants (n =23), and from infants with clinical evidence of sepsis (n =9). The samples were centrifuged and the plasma was recovered which was stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ . The quantification of Hsp-27, -60 and -70 was carried out by ELISA as previously reported by our research group.

*Results:* The gestational age of healthy term infants was  $38.5\pm 1.1$  weeks and in infants with sepsis was  $31.1 \pm 2.9$  weeks ( $p\leq 0.001$ ). The weight of healthy full-term infants was  $2,970\pm 441.0$  grams and in infants with sepsis was  $1300\pm 709.5$  g ( $p = 0.006$ ). Microbiological analysis performed on the blood of neonates with clinical sepsis data reported that 33.3% (3/9) growth of microorganisms such as: *E. coli* (1 case, M1), *E. epidermidis* (1 case, M5) and *S. dysgalactiae* (1 case, M7). Bacteria were not isolated in 66.7% of the analyzed samples. In 22.2% of cases, patients developed clinical data of chorioamnionitis (M1, and M3), while rupture of the fetal membranes occurred in 44.4% (M2, M3, M8, and M9). In 11.1%, clinical data on chorioamnionitis and premature rupture of the fetal membranes (M3) were presented simultaneously. Of the patients in whom the newborns developed clinical sepsis data, 27.2% presented data from preeclampsia clinicians (M5, M8, and M9) of whom 11.1% had severe preeclampsia (M7) and newborns presented with intrauterine growth. The concentration of Hsp-27 in healthy term infants was  $0.045\pm 0.024$  pg/mL which decreased 2.4-fold in neonates with sepsis ( $0.019\pm 0.006$  pg/mL;  $p = 0.004$ ). The concentration of Hsp-60 in healthy term infants was  $13.69\pm 5.3$  pg/mL which increased 1.8-fold in infants with sepsis ( $24.7\pm 3.0$  pg/mL;  $p\leq 0.001$ ). The concentration of Hsp-70 in healthy term infants was  $4.03 \pm 0.89$  pg/mL and 2.0-fold in infants with sepsis ( $7.9\pm 0.62$  pg/mL;  $p\leq 0.001$ ).

*Conclusions:* These results suggest that Hsp could help in the clinic for the identification of neonates with suspected sepsis.

*Keywords:* Neonatal sepsis; heat shock proteins.

## 1.0 INTRODUCCIÓN

La sepsis neonatal es un problema de salud pública a nivel mundial, su incidencia se presenta en 1 a 8 casos por cada 1,000 nacimientos; sin embargo, el desarrollo clínico de esta patología produce hasta el 40% de la mortalidad y morbilidad registradas anualmente en las unidades neonatales de cuidados intensivos. (1-3) En el Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes" en los últimos cinco años se tiene una incidencia del 2.3 % del total de los casos que han sido atendidos en la clínica.

El diagnóstico médico es particularmente difícil en los bebés prematuros y de bajo peso al nacer debido a la inmadurez del sistema inmunológico que hace que los signos y síntomas sean engañosos.(4) La evolución del proceso clínico-infeccioso puede llegar a comprometer la salud del neonato llevándolo a la muerte en cuestión de horas después de su detección clínica; esta condición se complica en neonatos prematuros con menos de 32 semanas de gestación y menores de 1500 gramos, en los cuales el diagnóstico oportuno representa un reto. (2, 5-10)

La corroboración clínica de la sepsis neonatal se realiza mediante el hemocultivo el cual es considerado el "estándar de oro" y constituye una importante herramienta de diagnóstico; sin embargo, este método presenta diversas limitaciones como son: 1) se requiere hasta 1.0 ml de sangre para ser analizada (3); 2) tiene baja sensibilidad y especificidad para la detección de microorganismos patógenos, ya que menos del 10% de las muestras analizadas se obtiene un resultado positivo (6); y 4) se requiere hasta de 48 horas para obtener un resultado. (6)

Se ha estimado a nivel mundial que hasta el 20 % de los neonatos con datos clínicos de sepsis han recibido diferentes esquemas de antibióticos sin que se logre determinar si los signos eran derivados de un proceso infeccioso, o a una regulación propia del recién nacido. (1, 3) Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de buscar biomarcadores que ayuden a la corroboración en el diagnóstico de sepsis neonatal temprana.

Actualmente en nuestro grupo de investigación se está comenzando a explorar el perfil de secreción de las proteínas de choque térmico (HSP) en diferentes procesos infecciosos, (11) así como en otras patologías obstétricas. (12) En el presente estudio nos hemos propuesto determinar la concentración de la HSP-27, -60 y de -70 en recién nacidos a término sanos y comparar estos valores con los neonatos prematuros con sepsis.

## 2. ANTECEDENTES

### *2.1 Epidemiología de la sepsis neonatal*

La incidencia de sepsis neonatal de acuerdo a la bibliografía internacional varía entre 1-8 por mil nacidos vivos. (6, 13) En México, en el Instituto de Perinatología, se reporta una incidencia de hasta 19 casos por cada 1,000 recién nacidos vivos. La incidencia de sepsis neonatal de acuerdo a los datos del National Neonatal Perinatal Database (2002) en la India es de 30 por cada 1000 nacidos vivos. (3) La tasa de mortalidad varía entre un 30-40% (1, 2) y se observan tasas más altas en recién nacidos prematuros y de bajo peso al nacimiento.

### *2.2 Clasificación*

De acuerdo con el intervalo de tiempo en el cual son evidentes y sostenidas las manifestaciones clínicas de los recién nacidos con sepsis ésta se clasifica como: 1) temprana, definida cuando el neonato desarrolla signos sugestivos de un proceso infeccioso que ocurre dentro de las primeras 72 horas de nacimiento; (1, 14) y 2) tardía cuando el proceso infeccioso aparece después de las 72 horas de vida extrauterina, el origen más frecuente es nosocomial o la adquirida en la comunidad, siendo las formas de presentación, vía respiratoria (neumonía), septicemia o meningitis, siendo estas las más frecuentes.

Los nacimientos prematuros (<37 semanas de gestación) son un factor de riesgo asociado a la sepsis neonatal temprana. Se desconoce con precisión cuales son las causas involucradas con la activación fisiopatológica de los nacimientos prematuros; (15, 16) sin embargo, se han determinado tanto las causas de origen neonatal como materna.

Entre las causas neonatales se encuentran alteraciones de la respuesta inmune innata, (17, 18) los defectos de los genes inmunorreguladores y la prematuridad se asocian con una incompleta maduración y/o función del sistema inmune innato (19); el peso al nacer también determina una gran susceptibilidad, especialmente peso muy bajo al nacer (<1500g); otros factores de riesgo neonatales incluyen sexo masculino, ictericia, puntuación de Apgar, retención de

líquido pulmonar, sufrimiento fetal, anemia, hemorragia intraventricular, hipotermia y trastornos metabólicos. (20, 21)

Diversas son las causas maternas atribuibles a los nacimientos prematuros, (22) identificándose a la obesidad, (23) nivel socioeconómico (24) y la etnia, (25) problemas hipertensivos, (26, 27) distenciones uterinas, hemorragia de la decidua (28) y con mayor asociación se encuentran las infecciones durante el embarazo que pueden dar lugar prematuramente tanto a la ruptura de las membranas fetales humanas (29, 30) y/o la activación del trabajo de parto. (31, 32)

Los microorganismos patógenos comúnmente asociadas a la sepsis neonatal temprana se encuentran hongos, virus, protozoarios, y las bacterias de las que se han aislado *Streptococcus agalactiae* y *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *estreptococos Viridans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenza*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococci* y *Pseudomonas aeruginosa*. (20)

### 2.3 Manifestaciones clínicas

El diagnóstico médico es particularmente difícil en los bebés prematuros y de bajo peso al nacer debido a la inmadurez del sistema inmunológico que hace que los signos y síntomas sean engañosos. La sepsis temprana se caracteriza por los siguientes signos: dificultad respiratoria que comienza después de 4 horas al nacimiento, convulsiones, necesidad de ventilación mecánica en un bebé a término y signos de shock, comportamiento y reactividad alterados, tono muscular alterado, dificultades e intolerancia en la alimentación, distensión abdominal, frecuencia cardíaca anormal (bradicardia o taquicardia), signos de dificultad respiratoria, hipoxia (cianosis central o saturación de oxígeno reducida), ictericia dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento, apnea, signos de encefalopatía, necesidad de reanimación cardiopulmonar, necesidad de ventilación mecánica, hipertensión pulmonar persistente, dificultad para regular su temperatura (inferior a 36°C o superior a 38°C) sin explicación por factores ambientales, sangrado excesivo inexplicable, trombocitopenia o coagulación anormal (INR > 2.0), oliguria persiste más allá de las 24 h después del nacimiento, alteración de la glucosa (hipoglucemia

o hiperglucemia), acidosis metabólica (déficit de base de 10 mmol/L o mayor), signos locales de infección. (20, 21, 33)

#### *2.4 Marcadores para el diagnóstico de sepsis neonatal.*

Después de que se ha determinado clínicamente la sepsis neonatal, se inicia el tratamiento terapéutico el cual está enfocado a la eliminación de la sintomatología infecciosa y normalizar los signos vitales del recién nacido. Se ha estimado a nivel mundial que hasta el 20 % de los neonatos con datos clínicos de sepsis han recibido diferentes esquemas de antibióticos sin que se logre determinar si los signos eran derivados de un proceso infeccioso, o a una regulación propia del recién nacido. (21, 33) Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de buscar otros biomarcadores que ayuden a la corroboración en el diagnóstico de sepsis neonatal temprana.

La utilidad de los marcadores de infección en el diagnóstico de la sepsis neonatal se ha evaluado en muchos estudios con diferentes resultados. Los niveles de biomarcadores se alteran durante el curso de la enfermedad, por lo tanto, estos pueden usar como indicaciones para diagnosticar la enfermedad tempranamente y así permitirnos monitorear adecuadamente y ayudar a un tratamiento eficiente de la enfermedad. Tradicionalmente, el diagnóstico de sepsis se ve favorecido por un recuento anormal de glóbulos blancos (inferior a 5000 células/ $\mu$ l, sensibilidad 0.2, especificidad 0.96; e inferior a 1000 células/ $\mu$ l, sensibilidad 0.3 especificidad 1.0), elevación del índice de glóbulos blancos inmaduros/glóbulos blancos totales (relación I:T mayor a 0.20, sensibilidad 0.55 y especificidad 0.74) y bajo recuento de plaquetas (menos de 50,000/ $\mu$ L, sensibilidad 0.8 y especificidad 0.99). Otros biomarcadores séricos son las proteínas de fase aguda, como la proteína C-reactiva (PCR), procalcitonina o elevación de citoquinas inflamatorias: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL-6). Todos pueden ayudar en el diagnóstico, pero no necesariamente confirmar la infección. (34, 35) La tabla 1 indica la sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo de biomarcadores útiles para el diagnóstico de sepsis neonatal.

**Tabla 1. Marcadores de laboratorio en el diagnóstico de sepsis neonatal temprana.**

PRUEBA	SENSIBILIDAD (%)	ESPECIFICIDAD (%)	VPN (%)	VPP (%)
<b>Parámetros del hemograma y activación de neutrófilos</b>				
Hemograma	Leucocitos: 0.1-22.6 Neutrófilos totales: 0.8-18.8 I/T: 13.1-54.6 Plaquetas: 0.8-22.9	Leucocitos: 79.3-99.99 Neutrófilos totales: 95.2-99.99 I/T: 61.9-95.7 Plaquetas: 89-99.4	No se reportan Área bajo la curva característica operativa del receptor: <0.686 para todos los parámetros y puntos de corte	
Expresión de neutrófilos CD64	75-100	68-77	96-100	2-29
Expresión de neutrófilos CD11b	96	100	100	99
<b>Reactantes de fase aguda</b>				
PCR (una sola medición)	64	56	93	14
PCR seriada	88.9	73.8	99.7	6
Procalcitonina	60-88	54-80	90	50
Puntuación ApoSAA (Apolipoproteína C2 en plasma y amiloide sérico A)	91-100	61-80	88-100	75-84
Proteínas inhibidoras inter alfa	89.5	99	98	95
Interleucina (IL) 8	44	90	83	58
IL 6	63-76	73-76	66-81	67-74
IL 8 + PCR	80	87	93	68
IL 6 + PCR	89	73	90	70
Factor de necrosis tumoral alfa	49-66	60-72	60-73	52-62

VPN, valor predictivo negativo; VPP, valor predictivo positivo; PCR, proteína C-reactiva. La información fue tomada de Wynn (36).

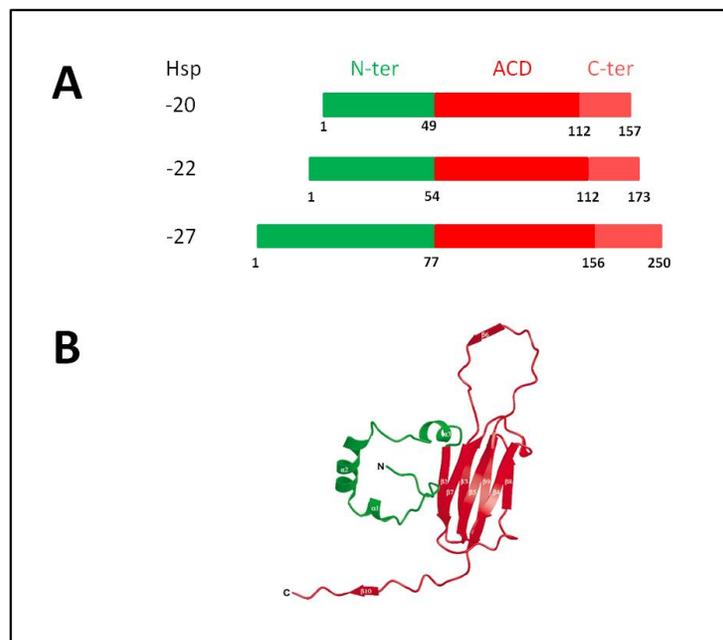
### 2.5 Proteínas de choque térmico

Las proteínas del choque térmico (HSP) fueron inicialmente descritas en la larva de *Drosophila melanogaster* la cual fue expuesta a incrementos de temperatura y se observó el aumento en la expresión de un grupo particular de proteínas las cuales fueron denominadas proteínas de choque térmico (HSP). (37) Las HSP son moléculas pequeñas de 20 a 100 Kilo Daltones (KDa) se encuentran ampliamente conservadas y se expresan en plantas, animales, y bacterias. (38) Las principales funciones biológicas se encuentra la homeostasis celular, (39) regulan tanto la conformación estructural y estabilidad del material genético (DNA, y RNA) como de las proteínas por lo que se les dio originalmente el término de “*chaperonas moleculares*”, reducen el estrés celular ocasionado por temperaturas extremas,

emisiones de luz ultravioleta, y por metabolismo oxidativo, (40) y recientemente han sido asociadas con la respuesta inmunológica. (41, 42)

Por su tamaño las HSP, han sido agrupadas en proteínas de bajo (20-, 22- y 27-KDa) y alto (40-, 60-, 70-, 90- y 100-KDa) peso molecular (43) con propiedades anti y pro inflamatorias respectivamente. (44, 45)

La figura 1 muestra la estructura, dominios de la HSP pequeñas y el peso molecular de entre 15 a 30 KDa (150 a 250 aminoácidos). El dominio amino-terminal presenta tres estructuras alfa ( $\alpha$ 1-3) que están poco conservadas y contiene regiones ricas en metionina. Este dominio funciona como molécula acompañante “*chaperona*”, no depende de la hidrólisis de ATP y su capacidad de unión a proteínas es reversible y previene la agregación parcial de las proteínas. (46)

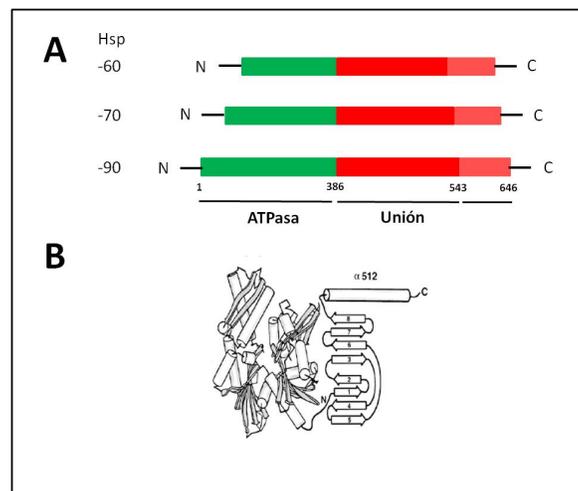


**Figura 1 Estructura de las HSP pequeñas.** (A) Dominios N-terminal (N-ter; verde),  $\alpha$ -cristalino (ACD; rojo), C-terminal (C-ter; rosa). (B) Estructura secundaria se observa los diferentes dominios de las hojas alfa y beta. Imagen tomada de van Montfort y cols., (47)

El siguiente dominio contiene aproximadamente 90 residuos de aminoácidos que forman estructuras de tipo  $\alpha$ -cristalinas (ACD; *alpha-crystallin domain*) similar

a la proteína del cristalino. Este dominio consiste de estructuras de tipo  $\beta$  compuesta por dos láminas antiparalelas con cuatro ( $\beta_2$ , ( $\beta_3$ ,  $\beta_9$ ,  $\beta_8$ ) y tres ( $\beta_7$ ,  $\beta_4$ ,  $\beta_5$ ) hojas (fig. 1B). (48) El dominio carboxilo-terminal presenta una hoja de tipo  $\beta$ . Este dominio es una región conservada que está implicada con la interacción entre monómeros y cambios en su secuencia reduce la capacidad de unión con el DNA y con otras proteínas (fig. 1). (47)

La figura 2 muestra la estructura, dominios de las HSP grandes las cuales contienen 646 aminoácidos, en la porción del amino-terminal está compuesta por 386 aa (44 KDa) y constituyen el dominio de tipo ATPasa el cual hidroliza ATP. Este dominio, tiene la función de distinguir diferentes conformaciones de las proteínas. El segundo dominio está ubicado entre la posición 387-543 aa (18 KDa) y constituye el sitio de unión el cual está involucrado con la capacidad de interactuar con otras proteínas y con receptores específicos (TLRs, por sus siglas en inglés Toll Like Receptos; CD36, CD40). El tercer dominio, está comprendido entre la posición 543-646 aa (10 KDa) representa la porción del dominio carboxilo terminal. (47-49)



**Figura 2 Estructura de las HSP grandes.** (A) Dominios amino-terminal de hidrólisis de ATP (*N*-; verde), dominio de unión (rojo), dominio carboxilo-terminal (*-C*; rosa). (B) Estructura secundaria se observa los diferentes dominios de las hojas alfa y beta. Imagen tomada de Kiang y Tsokos., (50)

Las HSP son proteínas altamente conservadas y se encuentran localizadas en el núcleo, citoplasma, membrana plasmática y en diferentes fluidos biológicos. (51, 52) Diferentes evidencias han demostrado que las HSP se encuentran en

células de la decidua, (53) placenta, (51, 52) cordón umbilical, (54) miometrio, (54) y en sangre de neonatos y niños pediátricos en unidades de cuidados intensivos. (55, 56)

## *2.6 Relación de las HSP y la respuesta inflamatoria*

Dentro del sistema de alarma celular temprana se encuentran las HSP, (57) y las proteínas de tipo  $\beta$ -defensinas, (58, 59) que de manera conjunta y coordinada activan tanto de las células profesionales (macrófagos, monocitos y células dendríticas) como en los tejidos inmunológicos (membranas fetales y placenta) para la secreción de diferentes citocinas involucradas con la respuesta inflamatoria. (60)

Se ha demostrado que los monocitos humanos al ser estimulados con la HSP-27 incrementa de manera dosis dependiente la secreción de interleucina (IL) de tipo 10 la cual se encuentra mediada por la proteína de tipo cinasa p38, (44, 61) en tanto que la HSP-60 y -70 incrementan la secreción de IL-1 $\beta$  y del factor de necrosis tumoral (TNF) de tipo alfa. (60)

Las propiedades antiinflamatorias de HSP-27 pueden ser utilizadas para diversos tratamientos asociados a procesos de enfermedades inflamatorias. (62) Asimismo, se ha demostrado que la administración de la HSP-27 da como resultado la protección contra el shock de endotoxinas letal y es altamente inducida en monocitos de pacientes con síndrome de shock inflamatorio sistémico. (44) Durante los períodos de homeostasis celular, los niveles de la HSP-70 están alrededor del 2% del contenido intracelular; sin embargo, este perfil de expresión cambia durante un estrés celular incrementando los niveles hasta 10-veces con respecto al estado basal. (44) Se ha propuesto, que el mecanismo por el cual la HSP-70 activa la respuesta inflamatoria esta mediada por el factor nuclear-kappa-beta (NF-k $\beta$ ) y la fosforilación de la proteína cinasa mitogénica (MAPK), mediando una respuesta pro o antiinflamatoria al estrés. (63, 64)

La proteína de choque térmico 70 (HSP-70) ha sido el foco de gran interés, particularmente durante la infección, con evidencia que sugiere un papel importante en el desarrollo de diversas enfermedades. Durante la homeostasis, HSP-70 actúa

como una molécula clave en la respuesta celular; así como de una chaperona molecular que facilita el transporte intracelular de proteínas; plegamiento y replegamiento de proteínas dañadas. Durante los períodos de homeostasis, los niveles de HSP70 están alrededor del 2% del contenido intracelular, pero durante un ataque fisiológico, los niveles celulares de HSP-70 pueden aumentar notablemente hasta un 20%. En condiciones in vitro se ha estimulado diversas líneas celulares con el lipopolisacárido el cual es un componente estructural de las bacterias gram negativas y se ha demostrado el incremento en la expresión de la HSP-70 y la secreción de diversas citocinas asociadas a la respuesta inflamatoria. La HSP-70 puede activar y desactivar las vías de señalización NF- $\kappa$ B y MAPK, mediando una respuesta pro o antiinflamatoria al estrés. La HSP-70 desempeña un papel importante en la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria en la sepsis, ya que parece cebar las células inmunitarias a un "ataque" potencial de organismos patógenos que promueven la rápida liberación de bactericidas como el óxido nítrico y mediadores inflamatorios. Si no se produce un "ataque", la célula puede "retirarse" rápidamente con el rápido descenso de los niveles extracelulares de HSP-70. (56, 65) Adicionalmente, la expresión de HSP-70 puede ser estimulada por la fiebre y existen correlaciones positivas entre los niveles séricos de HSP-70 y varios marcadores de inflamación. Los niveles séricos de HSP-70 también experimentan aumentos significativos con grados de inflamación cada vez mayores, además, el aumento de los niveles séricos de HSP-70 se ha asociado con la mortalidad por sepsis. (66-70)

Se ha demostrado que la HSP-60 actúa como potente estimulador de las respuestas inmunitarias. Cuando se libera en el medio extracelular, la HSP-60 aumenta los niveles de células CD4 + CD25 y suprime los linfocitos T citotóxicos. El aumento de la expresión de la superficie celular de HSP-60 sirve como una señal de peligro para el sistema inmunológico que culmina en la estimulación de las células dendríticas y, en última instancia, la inducción de respuestas inmunitarias antitumorales mediadas por células T. Se especulamos que las propiedades citoprotectoras y de señalización de HSP-60 extracelular pueden desempeñar un papel importante en la respuesta del huésped a la sepsis. Se ha reportado que los

niveles plasmáticos de HSP-60 extracelular son significativamente elevados en niños con choque séptico o lesión renal aguda (LRA) secundario a choque séptico en comparación con niños críticamente enfermos sin LRA o sepsis o en comparación con controles sanos. HSP-60 tuvo una alta validez para la predicción de casos de LRA con choque séptico. Por lo tanto, la HSP-60 podría estar desempeñando un papel en la patogénesis de sepsis en niños y podría utilizarse como herramienta de diagnóstico de LRA producida por choque séptico. (65, 71, 72)

La HSP-27 es un miembro de la llamada familia pequeña de proteínas de choque térmico (HSPB). Dentro de las células en reposo, ayuda a la degradación y eliminación de proteínas dañadas y también disminuye la velocidad de polimerización de microfilamento de actina. Al igual que varios miembros de la familia de proteínas de choque térmico, es altamente inducible por estrés. Tras el estrés celular se fosforila y pierde la capacidad de disminuir la velocidad de polimerización de la actina, lo que resulta en la estabilización del citoesqueleto celular. Además, se ha demostrado que protege las células contra la apoptosis mediante la prevención de la activación de la caspasa en sentido descendente. La HSP-27 extracelular parece poseer propiedades antiinflamatorias, y el tipo de célula objetivo determina la funcionalidad; sin embargo, el receptor a través del cual inhibe la inflamación todavía no está bien definido. También inhibe la apoptosis de neutrófilos y potencialmente permite la destrucción exagerada de tejidos durante la sepsis, el trauma y la lesión pulmonar aguda. En marcado contraste con la señal de peligro exógena, LPS, la HSP-27 inhibe la apoptosis de neutrófilos sin aumentar la producción de citoquinas proinflamatorias, asimismo induce la expresión de la citoquina antiinflamatoria, IL-10, en monocitos, principalmente a través de la ruta de la proteína quinasa p38, con solo un leve aumento en los niveles de TNF- $\alpha$ . Las propiedades antiinflamatorias de HSP-27 pueden explotarse potencialmente para el tratamiento de procesos de enfermedades inflamatorias. Asimismo, se ha informado que la inducción de HSP-27 da como resultado la protección contra el shock de endotoxinas letal y es altamente inducida en monocitos de pacientes con

síndrome de shock inflamatorio sistémico, lo que respalda su posible papel antiinflamatorio. (44, 65)

Recientemente, en nuestro grupo de investigación hemos demostrado mediante un modelo experimental de infección que *Escherichia coli* induce en las membranas fetales humanas la secreción de la HSP-60 y -70 de manera espacio-temporal; (11) lo anterior nos lleva a considerar que estas proteínas proinflamatorias (HSP-60 y -70) pueden estar incrementadas en los recién nacidos con sepsis como parte de su respuesta al proceso infeccioso inicial, en tanto que la proteína antiinflamatoria (HSP-27) podría estar disminuida como parte del balance proinflamatorio.

### 3.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La incidencia mundial de sepsis neonatal es alta, en un estudio reciente se estimó que 2202 recién nacidos por cada 100 000 nacidos vivos desarrollan sepsis con una mortalidad del 11-19%, lo que equivale a 3 millones de casos de sepsis neonatal anualmente. (73)

La sepsis neonatal ocasiona la muerte o una discapacidad importante en el 39% de los afectados incluso con tratamiento antimicrobiano oportuno. La incidencia de sepsis severa en recién nacidos se duplicó (desde 4.5 a 9.7 casos por cada 1,000 nacimientos) entre 1995 y 2005. La frecuencia varía inversamente a la edad gestacional al nacer y puede llegar al 60% en la mayoría de los bebés inmaduros. Ni el tratamiento de la sepsis neonatal ni los resultados del neurodesarrollo en los bebés que sobreviven tienen cambiado significativamente en los últimos 30 años a pesar de múltiples intentos fallidos de reducir la carga de la infección. Estas decepciones han ocurrido en el contexto de tremendos avances en otras áreas de la atención del recién nacido, incluida la nutrición, manejo de dificultad respiratoria e hipertensión pulmonar, y enfriamiento terapéutico después de encefalopatía hipoxico-isquémica. (36)

En México, los fallecimientos registrados en el primer día de vida del recién nacido se deben a problemas relacionados fundamentalmente con dificultad respiratoria, inmadurez, anomalías congénitas y problemas durante el parto; durante la primera semana de vida se mezclan con las causas antes mencionadas las infecciones del recién nacido como la sepsis y la neumonía congénita; al rebasar la primera semana de vida la sepsis bacteriana incrementa su frecuencia y le siguen en importancia los problemas respiratorios debidos a inmadurez. Se ha reportado en nuestro país una incidencia de sepsis de 4 a 15.4 casos por cada 1000 recién nacidos vivos (73)

Los signos y síntomas clínicos de la sepsis neonatal a menudo son inespecíficos y los cultivos microbianos de sangre u otros fluidos corporales estériles son el oro estándar en el diagnóstico, sin embargo los hemocultivos tienen baja sensibilidad en neonatos por los siguientes motivos: bajo grado de bacteriemia neonatal, pequeños volúmenes de inoculación en frascos de cultivo, y el uso de

antibióticos intraparto, además, los resultados del cultivo microbiano no están disponibles durante al menos 24 a 72 horas; por lo que es necesario buscar marcadores nuevos para un diagnóstico y tratamiento tempranos, ya que estos pueden ser críticos para mejorar resultados neonatales y además el sobrediagnóstico de sepsis neonatal puede llevar a uso inapropiado de antibióticos que puede fomentar la resistencia a los antibióticos.

En el presente proyecto de investigación, nos hemos propuesto contestar la siguiente pregunta de investigación. ¿Existirá variaciones en la concentración de la HSP-27 (antiinflamatoria), -60, y -70 (proinflamatorias) en los recién nacidos prematuros con sepsis con respecto a los recién nacidos sanos a término?

#### **4.0 JUSTIFICACION**

La Asamblea Mundial de la Salud (2017) emitió una resolución sobre la sepsis como una prioridad clave para la próxima década. En dicha reunión se estableció que la incidencia de sepsis neonatal aumento 40 veces y su mortalidad se incrementó 2 veces en países de bajos ingresos con respecto a los países desarrollados. (1, 3, 33)

La sepsis de origen temprano sigue siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los recién nacidos principalmente en prematuros y por lo tanto un desafío a nivel mundial. (67, 69) La identificación y el diagnóstico temprano es un desafío para los neonatólogos ya que las características clínicas son inespecíficas y difíciles de diferenciar de las de etiologías no infecciosas. El repertorio de pruebas de laboratorio auxiliares también es limitado y no siempre confiable. Más del 95% de los bebés tratados con antibióticos por sospecha de infección finalmente demuestran no tener evidencia de infección. (33)

El biomarcador diagnóstico ideal debe exhibir propiedades comunes que incluyen alta sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo. Los marcadores clínicos eficaces en adultos y en niños lo son en menor medida en los recién nacidos prematuros dado que en estos pacientes los signos clínicos tempranos son

inespecíficos y sutiles, y los parámetros habituales para evaluar sepsis no ofrecen la suficiente sensibilidad y especificidad para evaluar la sepsis de origen temprano. (67, 69) El hemocultivo que se considera el estándar de oro para la identificación de casos con sepsis neonatal; sin embargo, el porcentaje de casos positivos es muy bajo y requiere demasiado tiempo, lo que limita su uso como base para el inicio empírico de antibióticos. (67)

En los pacientes pediátricos existen estudios que han demostrado que las proteínas de choque térmico (HSP) pueden ser marcadores tempranos; (66, 68, 70) sin embargo, en el recién nacido y prematuro no se ha descrito dicha relación y su posible asociación con el desarrollo de sepsis. Por lo anterior las proteínas de choque térmico pueden representar nuevos marcadores de infección temprana permitiendo el inicio oportuno del tratamiento adecuado y de esa forma mejorar los resultados neonatales.

## 5.0 OBJETIVOS E HIPÓTESIS

### 5.1 *Objetivo general*

Determinar la concentración de las proteínas de choque térmico (HSP) en el suero de recién nacidos a término sanos y prematuros con sepsis.

### 5.2 *Objetivos específicos*

1. Cuantificar la HSP-27, -60, y -70 en el suero de recién nacidos a término sanos.
2. Cuantificar la HSP -27, -60 y -70 en el suero de recién nacidos prematuros con sepsis y hemocultivo positivo.
3. Cuantificar la HSP -27, -60 y -70 en el suero de recién nacidos prematuros con sepsis y hemocultivo negativo.
4. Comparar las concentraciones de las proteínas de choque término entre los tres grupos de estudio.

### 5.3 *Hipótesis*

H1: La concentración de la proteína de choque térmico HSP-27 en recién nacidos prematuro con sepsis será menor en comparación a la de los recién nacidos a término sanos.

H2: La concentración de las proteínas de choque térmico HSP-60 y -70 en recién nacidos prematuros con sepsis será mayor en comparación a la de los recién nacidos a término sanos.

H3: La concentración de las HSP en recién nacidos prematuros con sepsis y hemocultivo negativo será similar a la de los recién nacidos prematuros con hemocultivo positivo.

## 6.0 MATERIAL Y METODOS

Para demostrar los objetivos planteados en el presente estudio el tipo de investigación que se realizó fue observacional en el cual se incluyó recién nacidos prematuros con sepsis y a término sanos a los cuales se les tomó en una sola ocasión sangre periférica, por lo que el tipo de diseño será un estudio de tipo transversal, analítico, con una temporalidad transversal, y prolectivo. Tanto la captura de las pacientes como la cuantificación de las proteínas de choque térmico se realizará en el Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes.

### 6.1 *Universo de los pacientes de estudio*

Para cumplir con los objetivos específicos hemos considerado un universo o población a dos grupos de estudio 1) recién nacidos a término sanos; y 2) recién nacidos prematuros con sepsis con y sin hemocultivo positivo.

#### 6.1.1 *Criterios de inclusión*

- Recién nacidos prematuros con datos sugestivos de sepsis y hemocultivo positivo o negativo, y sin haberles administrado antibióticos previos a la toma de la muestra
- Recién nacidos a término sanos

#### 6.1.2 *Criterios de exclusión*

- Recién nacidos prematuros sin datos sugestivos de sepsis
- Recién nacidos prematuros o a término con malformaciones congénitas mayores

#### 6.1.3 *Criterios de eliminación*

- Recién nacidos prematuros con sepsis o a término sanos con muestra insuficiente al momento del proceso.

### 6.2 *Variables de estudio*

A) Independiente: *sepsis neonatal temprana*:

Definición operativa

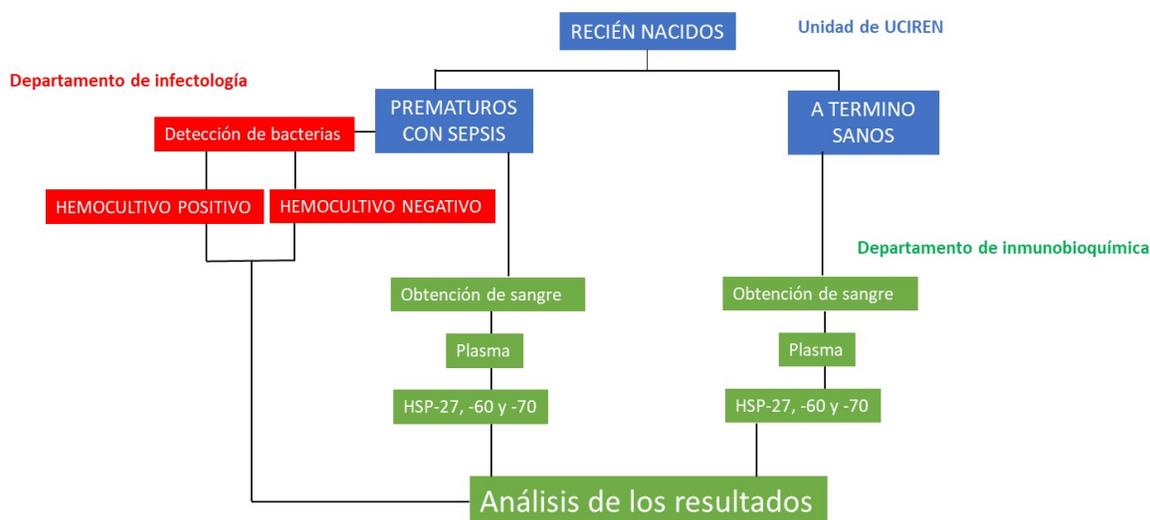
Sepsis neonatal temprana: infección bacteriana comprobada por cultivo de sangre y/o por marcadores clínicos y paraclínicos usados en el Instituto Nacional de Perinatología en el recién nacido prematuro que ocurre en las primeras 72 horas de vida

B) Dependiente: Concentración de proteínas de choque térmico.

Definición operativa:

Concentración de proteínas de choque térmico: Medida de proteínas de choque térmico, en pg/ $\mu$ g, en el suero de recién nacidos prematuros con sepsis y a término sanos.

### 6.3 Procedimiento



**Procedimiento general del estudio.** La toma de la sangre se efectuó en la unidad de UCIREN, el análisis microbiológico se determinó en el departamento de Infectología y el desarrollo experimental se realizó en el departamento de Inmunobioquímica.

Los recién nacidos del grupo de prematuros con sepsis en el estudio usaremos los criterios vigentes en el Instituto Nacional de Perinatología para el diagnóstico o sospecha de sepsis de este grupo de pacientes que ingresen a las terapias neonatales y que sea posible la obtención de muestras de sangre, y para el grupo de recién nacidos sanos incluiremos a aquellos pacientes con edad gestacional mayor o igual a 37 semanas y cuyas madres no hayan presentado alguna patología obstétrica previa a la nacimiento.

#### 6.4 Obtención de las muestras

Se obtuvieron 0.5 mL de sangre periférica de neonatos con evidencias sugestivas de sepsis de los grupos de estudio. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm por 15 min, y se obtuvo el plasma. Finalmente, el plasma fue almacenado a -80°C hasta la cuantificación de las HSPs.

#### 6.5 Cuantificación de la HSP mediante el método de ELISA.

La determinación de la HSP-27 (DY1580, R&D Systems); -60 (DYC1800-5), y -70 (DY1663-05) de cada paciente se realizó por duplicado mediante el método de ELISA como previamente ha sido reportado por nuestro grupo de investigación. (11) Las HSP-27, -60 y -70 fueron analizadas en microplacas independientes de 96 pozos y el procedimiento consistió en incubar toda la noche a temperatura ambiente con 100 µl del anticuerpo de captura. La microplaca fue sellada con la membrana adhesiva para evitar evaporación (SealPlate, Excel Scientific; CA, USA). El anticuerpo de captura permitirá la fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente a detectar.

Después de la incubación se realizó la aspiración y lavado de la placa, con buffer de lavado que contiene 0.05% de Tween 20® en PBS, este paso se repitió tres veces, entre cada una de las incubaciones. Posteriormente se adiciono el buffer de bloqueo que contiene 1%BSA, 0.00 5% NaN<sub>3</sub> en PBS y se incubo por 1 hora a temperatura ambiente. En los primeras pozos se colocaron 100 µl de la curva estándar (tabla 2) que corresponden a 8 puntos de la curva estándar IC Diluent #4 que contiene 1 mM EDTA, 0.5% Triton™ X-100 in PBS (primeras dos columnas de la placa) en la siguiente columna se adicionaron En cada pozo se colocaron 100 µL del suero de cada una de las pacientes en cada uno de los pozos la placa se incubó por 2 horas a temperatura ambiente. En este paso si está presente el agente de diagnóstico (antígeno) reaccionara específicamente con los anticuerpos fijados en la placa.

**Tabla 2** Rango de la curva estándar de las proteínas de choque térmico

HSP	Curva estándar
-27	31.3 a 2,000 pg/mL
-60	0.625 a 40 ng/mL
-70	156.2 a 10,000 pg/mL

Al término del tiempo se realizó el lavado de la placa como se mencionó previamente y se agregó el anticuerpo de detección a una concentración de 1.0 ug/ml en IC Diluent #1 el cual contiene 1%BSA y se dejó reposar por 2 horas a temperatura ambiente, se repitió la aspiración y el lavado y se agregó Streptavidin-HRP diluido a cada pocillo el cual se dejó incubando 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se colocó la solución de sustrato la cual se dejó a las mismas condiciones que el Streptavidin y finalmente se adicionó la solución de paro. La placa fue leída en un lector de microplacas a una longitud de onda de 450-540 nm y los resultados fueron expresados en unidades de pg/ $\mu$ g de proteína.

#### 6.6 Análisis estadístico

Los datos epidemiológicos entre ambos grupos serán analizados con la prueba de *t*-student y para establecer la diferencia en la concentración de las HSP se realizará la prueba de ANOVA seguida de Tukey y se considerará una diferencia significativa menor a 0.05.

#### 6.7 Aspectos éticos

Previo a la toma de las muestras de sangre de los neonatos se obtuvo el consentimiento informado de las madres en donde se les explicó la finalidad del proyecto de investigación, el cual fue aprobado por los comités de investigación y ética y cuenta con número de registro institucional 212250-3210101 (anexo 1). Se les informó que la obtención de la sangre será tomada por el médico especialista después del nacimiento de su bebé y que este procedimiento no afectará con el

bienestar de su bebé. Finalmente, se le entregó la carta de consentimiento informado para que la paciente firmará de manera libre (anexo 2).

De acuerdo con el artículo 17 del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, la participación de los pacientes en este estudio conlleva un tipo de riesgo: mínimo.

## 7.0 RESULTADOS

### 7.1 Datos epidemiológicos

De julio de 2018 a junio del 2019 se capturaron un total de 35 muestras de sangre de neonatos de los cuales se dividieron en recién nacidos a término sanos (n=23) y prematuros con sepsis (n=9). La tabla 2 muestra las características maternas y neonatales entre los grupos de estudio.

**Tabla 3** Características maternas y neonatales

Características	Recién nacidos a término sanos (n=23)	Recién nacidos prematuros con sepsis (n=9)	Valor p
<b>Condiciones maternas</b>			
Edad, años	28.3 ± 7.5	25.3 ± 6.9	0.315
IMC, Kg/cm <sup>2</sup>	25.7 ± 6.5	27.5 ± 8.5	0.630
<b>Embarazos vivos previos</b>			
0 n (%)	11 (48)	5 (56)	0.322
1 n (%)	4 (17)	1 (11)	0.308
2 n (%)	5 (22)	3 (33)	0.113
3 n (%)	1 (4)	0 (0)	0.365
4 n (%)	2 (9)	0 (0)	0.023
CAM, n (%)	0 (0)	2 (22)	0.013
RPM, n (%)	0 (0)	4 (44)	0.001
CAM + RPM, n (%)	0 (0)	1 (11)	0.013
PE, n (%)	0 (0)	0 (0)	1.0
PE severa, n (%)	0 (0)	1 (18)	0.001
Fiebre >38°C, n (%)	0 (0)	0 (0)	
<b>Inflamación histológica</b>			
Membranas fetales, n (%)	0 (0)	1 (9)	0.013
Umbilical, n (%)	0 (0)	0 (0)	1.0
Placenta, n (%)	0 (0)	0 (0)	1.0
<b>Condición neonatal</b>			
<b>Sexo</b>			
Masculino, n (%)	10 (43)	5 (45)	
Femenino, n (%)	13 (56)	6 (54)	0.886
Edad gestacional, semanas	38.6 ± 1.1	32.4 ± 4.0	0.001
Peso al nacimiento, g	2,970.5 ± 441.0	1,678 ± 911	0.002
Irritabilidad	0 (0)	0 (0)	
APGAR at 5 min <8, n (%)	0 (0)	9 (82)	0.001
Fiebre >38°C, n (%)	0 (0)	0 (0)	

IMM: índice de masa muscular; CAM: corioamnionitis; RPMF: ruptura prematura de las membranas fetales; PE: preeclampsia. Los datos se presentan como la media ± DE.

La edad materna ( $p = 0.315$ ), el índice de masa muscular ( $p = 0.630$ ) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos (tabla 2). Dos pacientes (9.0%) del grupo control mostraron cuatro gestas previas las cuales fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo de prematuros con sepsis ( $p = 0.023$ ; tabla 2). La vía de nacimiento de los paciente prematuros en todos los casos fue por cesárea y en el caso de los neonatos de término 8 nacieron por parto y 15 mediante cesarea.

Las madres de neonatos prematuros con sepsis desarrollaron corioamnionitis (22%), ruptura prematura de las membranas fetales con 2 (22.0%), 7 (11.0%), y 8 (11.5%) días de evolución y en uno de los casos se presentó simultáneamente corioamnionitis y ruptura prematura de las membranas fetales (11.0%) y en uno de los casos se presentó el desarrollo de preeclampsia severa (11.0%; tabla 2). Cabe mencionar que todas ellas recibieron esquema antimicrobiano previo al nacimiento y esquema de maduración pulmonar con betametasona.

La edad gestacional y el peso de los prematuros con sepsis disminuyo significativamente 1.1-veces ( $p \leq 0.001$ ) y 1.7-veces ( $p = 0.006$ ; tabla 3) respectivamente en relación a los recién nacidos a término sanos (tabla 2).

La tabla 3 muestra las bacterias detectadas en relación con el diagnóstico materno de los neonatos prematuros con sepsis. En el 33.3 % (3/9) se detectó el crecimiento de microorganismos: *E. coli* (1 caso, M1); *E. epidermidis* (1 caso, M5) y *S. dysgalactiae* (1 caso, M7). En el 66.7% de las muestras analizadas no se aislaron bacterias (tabla 3).

**Tabla 4** Diagnóstico clínico de los recién nacidos prematuros con sepsis.

Muestra	Edad gestacional (semanas)	Sexo	Peso (g)	Microorganismo	Diagnóstico clínico materno
1	33.4	F	1160	<i>E. coli</i>	CAM
2	31.0	F	1060	ND	7 días de RPMF
3	34.4	M	2485	ND	8 días de RPMF, sin datos de CAM
4	30.0	F	1300	ND	Sin datos clínicos de patologías
5	27.0	M	636	<i>E. epidermidis</i>	Sin datos clínicos de patologías
6	28.3	M	1085	ND	Sin datos clínicos de patologías
7	36.0	M	2700	<i>S. dysgalactiae</i>	PE severa
8	31.1	F	1380	ND	2 días de RPMF
9	33.4	M	2094	ND	2 días de RPMF

F; femenino, M; masculino, ND; no detectado, CAM; corioamnionitis, RPM; ruptura prematura de las membranas fetales.

En el 22.2% de los casos, las pacientes desarrollaron datos clínicos de corioamnionitis (M1, y M3), en tanto que la ruptura de las membranas fetales se presentó en el 44.4% (M2, M3, M8, y M9). En el 11.1% se presentó simultáneamente datos clínicos de corioamnionitis y ruptura prematura de las membranas fetales (M3). De las pacientes en las que los recién nacidos desarrollaron datos clínicos de sepsis, el 27.2% presentaron datos de clínicos de preeclampsia (M5, M8, y M9) de las cuales el 11.1% tuvieron preeclampsia severa (M7) y recién nacido presentó restricción del crecimiento intrauterino.

## 7.2 Cuantificación de las HSP

La tabla 5 muestra la cuantificación de la HSP-27, -60, y -70 en el suero de recién nacidos a término sanos, y de los prematuros con sepsis.

**Tabla 5** Cuantificación de las HSP en el suero de los neonatos.

	Recién nacidos a término sanos (n=23)	Recién nacidos prematuros con sepsis (n=9)	<i>p</i>
HSP (pg/mL)			
-27	0.045±0.024	0.019±0.006	0.004
-60	13.69±5.3	24.7±3.0	0.001
-70	4.03±2.6	7.9±0.62	0.001

Proteínas de choque térmico (HSP); los valores se presentan como la media ± DE;

### 7.2.1 HSP-27

La concentración de la HSP-27 en los neonatos a término sanos fue de 0.045±0.024 pg/mL la cual disminuyó significativamente 2.3-veces con respecto a los neonatos prematuros con sepsis ( $p = 0.004$ ; tabla 4).

### 7.2.2 HSP-60

La concentración de la HSP-60 en los recién nacidos a término sanos fue de 13.69±5.3 pg/mL la cual aumentó significativamente 1.8-veces con respecto a los neonatos prematuros con sepsis ( $p \leq 0.001$ ; tabla 4).

### 7.2.3 HSP-70

La concentración de la HSP-70 en los recién nacidos a término sanos fue de 4.03±2.6 pg/mL la cual aumentó significativamente 2.0-veces con respecto a los neonatos prematuros con sepsis ( $p \leq 0.001$ ; tabla 4).

### 7.3. Cuantificación de las HSP y el resultado del hemocultivo en los prematuros con sepsis

La tabla 6 muestran la concentración de las HSP de los recién nacidos prematuros con sepsis y el resultado del hemocultivo.

**Tabla 6** Hemocultivo y valores de las HSP

Muestra	Microorganismo	HSP		
		-27	-60	-70
1	<i>E. coli</i>	0.03	20.23	7.3
2	ND	0.028	20.33	7.23
3	ND	0.027	25.33	7.65
4	ND	0.019	27.1	8.2
5	<i>E. epidermidis</i>	0.023	24.7	8.39
6	ND	0.013	24.7	8.6
7	<i>S. dysgalactiae</i>	0.02	25.3	8.5
8	ND	0.013	23.8	6.98
9	ND	0.018	17.9	8.3

ND; no detectado.

#### 7.3.1 Cuantificación de las HSP-27 con el resultado del hemocultivo

La cuantificación de la HSP-27 en los recién nacidos prematuros con hemocultivo negativo fue de  $0.018 \pm 0.007$  y este valor aumento 1.2-veces en los recién nacidos prematuros con hemocultivo positivo; sin embargo, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.05$ ; tabla 6).

#### 7.3.2 Cuantificación de las HSP-60 con el resultado del hemocultivo

La cuantificación de la HSP-60 en los recién nacidos prematuros con hemocultivo negativo fue de  $24.3 \pm 3.4$  y este valor aumento 1.0-veces en los recién nacidos prematuros con hemocultivo positivo; sin embargo, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.05$ ; tabla 6).

### *7.3.3 Cuantificación de las HSP-70 con el resultado del hemocultivo*

La cuantificación de la HSP-70 en los recién nacidos prematuros con hemocultivo negativo fue de  $7.65 \pm 0.63$  y este valor aumento 1.1-veces en los recién nacidos prematuros con hemocultivo positivo; sin embargo, no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.05$ ; tabla 6).

## 8.0 DISCUSIÓN

Los principales resultados obtenidos en el desarrollo del presente estudio son 1) la HSP-27 disminuyó su concentración en los recién nacidos prematuros con evidencias clínicas de sepsis con respecto a los recién nacidos a término sanos (tabla 5); 2) la HSP-60 y -70 aumentaron en los recién nacidos prematuros con evidencias de sepsis con respecto a los recién nacidos a término sanos (tabla 5); 3) en los recién nacidos prematuros el hemocultivo fue positivo en el 33.3% del total de las muestras analizadas (3/9) y al comparar la concentración de las HSP de los recién nacidos con hemocultivo negativo y positivo no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

Se ha demostrado que las proteínas de choque térmico de 60- y 70-KDa aumentan en pacientes pediátricos con choque séptico y han sido asociadas con el incremento en la respuesta inflamatoria (15), sin embargo no existe literatura y no se conoce el perfil de secreción de las HSP en neonatos prematuros con evidencias clínicas de sepsis por lo que nuestro estudio, donde ha determinado una función diferencial de las HSP-27, HSP-60 y HSP-70, y este trabajo puede ser un primer acercamiento a este al perfil de HSP en el recién nacido.

Los niveles de HSP-70 incrementaron de forma significativa en aquellos recién nacidos con sepsis en comparación con aquello que no la tenían esto concuerda con lo reportado por Wheeler y cols., (70), quienes encontraron un incremento significativo de los niveles de HSP-70 en los 94 pacientes con sepsis y choque septico que incluyeron en su estudio de los cuales 14 eran neonatos pero no especifica la edad gestacional de estos, notamos que este estudio lo niveles de HSP 70 fueron hasta 16000 veces mayor que lo reportado en nuestro estudio y en el caso de sus controles los niveles fueron 2000 veces mayores de lo reportado por nosotros, esto quizas debido a las diversas edades y a que los pacientes enfermos en dicho estudio tuvieron choque septico, no así los recién nacidos que nosotros incluimos, y en el caso de sus controles fueron paciente con patologías crónicas establecidas como cardiopatías entre otros.

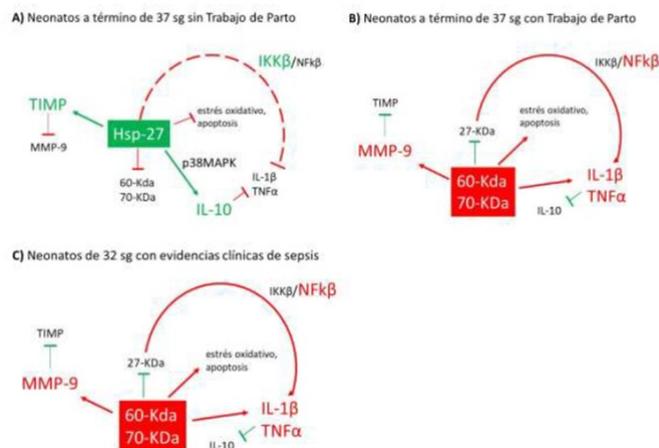
De igual forma en los niveles de HSP-60 incrementaron de forma significativa en nuestros pacientes con sepsis lo cual también concuerda con lo reportado por Wheeler y cols., (72), donde en los 63 paciente incluidos de 0 a 20 años y de los cuales no se especifica el número de recién nacidos, la HSP-60 se elevó significativamente en aquellos con sepsis y choque séptico en comparación con los controles, acá también nos llama la atención que los niveles en los enfermos fueran 600 veces mayores a lo reportado en el presente estudio, sin embargo los niveles en los controles fueron de 0 en los pacientes incluidos por Wheeler y en nuestro estudio la media fue de 13.7; también esto puede ser debido a la heterogeneidad de las edades en los pacientes incluidos en el estudio de Wheeler, y comentado previamente respecto a la HSP-70.

La HSP-27 está involucrada con la protección celular reduciendo la producción de moléculas asociadas con el estrés oxidativo, apoptosis y de la respuesta inflamatoria mediante el incremento en la expresión del inhibidor de la proteína del factor de transcripción kappa-beta ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ ) (44, 65), esto coincide con nuestros resultados donde se muestra que la concentración de la HSP-27 en recién nacidos a término sanos disminuyó en relación a los casos de los neonatos prematuros con sepsis.

Algunas de las limitaciones de nuestro estudio es primeramente el tamaño de nuestra muestra muy pequeño que dificulta nuestro análisis pero que logra hacer un acercamiento a lo que sucede en general; las diferencias en las características de nuestros pacientes puesto que el grupo control son pacientes de término y el nuestro grupo de enfermos son prematuro, si bien hay aspectos en los que los grupos son homogéneos como son las edades y composición corporal maternas, los riesgos maternos (en nuestro centro atendemos embarazos de alto riesgo), tampoco hay diferencias en la distribución de sexos de ambos grupos, sin embargo la prematuridad conlleva varias variables confusoras en la evolución de estos paciente desde los antecedentes maternos de infecciones, uso de esteroides o antibióticos, la reanimación, datos de hipoxia, peso menor de 1500g, uso de dispositivos para la ventilación, dificultad para la alimentación, entre los más importantes, variables que no hemos tomado en cuenta para el análisis, por lo que

es importante estudios de mayor inclusión, donde podamos tomar en cuentas estas covariables e incluso comparar un grupo solo de prematuros o solo de recién nacidos a término, puesto que si bien la biología de las proteínas de choque término está altamente conservada, podrían haber diferencias dado estas mismas variables confusoras de acuerdo a la edad gestacional.

La figura 3 indica un modelo de acción integral de las HSP tanto en la respuesta anti y proinflamatoria. Como hallazgo secundario se ha demostrado que el trabajo de parto activa la respuesta inflamatoria lo que reduce la expresión de la HSP-27. (39, 62, 67), al separar a las pacientes a término con y sin trabajo de parto se reduce la concentración de la HSP-27 ( $0.02 \pm 0.007$ ) lo que activa el perfil de expresión de la HSP-60 y -70 a  $20.3 \pm 3.1$  y  $7.0 \pm 1.11$  respectivamente (datos no presentados en resultados), de manera similar observamos la disminución en la concentración de estas HSP-27 en los casos de los recién nacidos con sepsis, esto apoya nuestra idea de que las circunstancias proinflamatorias (sepsis y trabajo de parto) favorecen la expresión de HSP-70 y -60 y disminuyen la concentración de HSP-27.



**Figura 3. Interacción de las HSP y la respuesta inflamatoria. (A)** En el suero de los neonatos sanos a término (37 SDG) sin trabajo de parto la HSP27 favorece la expresión de la proteína inhibidora (Ikkβ) asociada al activador transcripcional del factor nuclear (NFκβ) reduciendo la secreción de la interleucina (IL) de tipo 1-β y del factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNFα). Se ha reportado que la HSP-27 aumenta la expresión del inhibidor tisular de las metaloproteasas (TIMP9 inactivando la acción colagenolítica de la MMP-9. **(B)** La activación del trabajo de parto reduce la expresión de la HSP27 y aumenta la expresión de la HSP-60 y HSP-70 (tabla 5) lo que ha sido asociado con la expresión del NFκβ aumentando la secreción de la IL-1β, TNFα y de la MMP-9. **(C)** En los neonatos con evidencias de sepsis tiene el mismo perfil de regulación que en el trabajo de parto; sin embargo, este proceso se inicia en la semana 32 de gestación.

Pese a nuestras limitaciones la importancia clínica de nuestro trabajo es que tenemos por primera vez un acercamiento a la expresión de las proteínas de choque térmico en recién nacidos prematuros con sepsis y mas aun pudimos ver que hay una expresión diferencial en relación con otros recién nacidos que no tienen sepsis, incluso vemos que no hubo diferencias entre el mismo grupo de paciente con hemocultivos positivos o negativos, de manera que es un marcador prometedor para el diagnostico temprano de sepsis en recién nacidos con menos dificultades, nos atrevemos a decir, que los hemocultivos; de manera que nuestro trabajo puede marcar la pauta para otros con mayor inclusión de pacientes y control de variables confusoras, dado que esta proteínas, como hemos dicho, pueden llegar a ser un excelente marcador temprano y además son relativamente fácil de medir, con métodos accesibles y a un costo bajo y para la mayoría de los centros que atienden recién nacidos con características especiales como lo es la prematurez. Todo esto sin duda podrá ayudar a la mejora en la evolución y pronostico a corto, mediano y largo plazo de estos pacientes, disminuyendo grandes costos en la atención.

## **9.0 CONCLUSIONES**

Con estos resultados demostramos que es factible cuantificar a las HSP en el suero de los recién nacidos y que el desarrollo de sepsis en recién nacidos prematuros modula de manera diferencial la expresión de las HSP, por lo que estas proteínas pueden ser de utilidad como marcadores tempranos para el diagnóstico de sepsis neonatal.

## 10.0 PRODUCTOS DERIVADOS DE ESTE ESTUDIO



**CONGRESO NACIONAL DE NEONATOLOGÍA**

**CONGRESO NACIONAL DE ENFERMERÍA NEONATAL**

**MAZATLÁN**  
Mazatlán International Center  
31 de Enero al 3 de Febrero, 2019

**FEDERACIÓN NACIONAL DE NEONATOLOGÍA DE MÉXICO A.C.**

Otorga la Presente  
**CONSTANCIA**

**DR. ARTURO ALEJANDRO CANUL EUAN**

**Por su participación como Asistente**

Mazatlán, Sinaloa 31 de Enero al 03 Febrero 2019

  
Dra. Rosangela Ochoa Espinoza  
Presidenta de la Asociación de Neonatología de Sinaloa, A.C.

  
Dr. Raúl Villegas Silva  
Presidente FNNM 2017-2019

  
Mtra. Adela Ibarra Arrearán  
Coordinadora IX Congreso de Enfermería Neonatal

RECONOCIDO POR EL CONSEJO MEXICANO DE CERTIFICACIÓN EN PEDIATRÍA CON UN TOTAL DE 5 PUNTOS DE VALOR CURRICULAR PARA FINES DE EDUCACIÓN MÉDICA CONTINUA CON LA CLAVE **CMCP-PED-F 0719**  
"RECONOCIDO POR EL CONSEJO MEXICANO DE CERTIFICACIÓN EN PEDIATRÍA, SECCIÓN NEONATOLOGÍA, A.C. CON 37 HRS. DE VALOR CURRICULAR PARA FINES DE EDUCACIÓN MÉDICA CONTINUA CON LA CLAVE **CMCP-NEO-002-19**"

## 11.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, International Consensus Conference on Pediatric S. 2005. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med* 6:2-8.
2. Gonzalez BE, Mercado CK, Johnson L, Brodsky NL, Bhandari V. 2003. Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. *J Perinat Med* 31:60-8.
3. Sankar MJ, Agarwal R, Deorari AK, Paul VK. 2008. Sepsis in the newborn. *Indian J Pediatr* 75:261-6.
4. Shane AL, Sanchez PJ, Stoll BJ. 2017. Neonatal sepsis. *Lancet* 390:1770-1780.
5. Couto RC, Barbosa JA, Pedrosa TM, Biscione FM. 2007. C-reactive protein-guided approach may shorten length of antimicrobial treatment of culture-proven late-onset sepsis: an intervention study. *Braz J Infect Dis* 11:240-5.
6. Jordan JA, Durso MB. 2005. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn* 7:575-81.
7. Kocabas E, Sarikcioglu A, Aksaray N, Seydaoglu G, Seyhun Y, Yaman A. 2007. Role of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of neonatal sepsis. *Turk J Pediatr* 49:7-20.
8. Mussap M, Degrandi R, Cataldi L, Fanos V, Plebani M. 2007. Biochemical markers for the early assessment of neonatal sepsis: the role of procalcitonin. *J Chemother* 19 Suppl 2:35-8.
9. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong W, Wong RP, Cheung KL. 1997. Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 77:F221-7.
10. Vazzalwar R, Pina-Rodrigues E, Puppala BL, Angst DB, Schweig L. 2005. Procalcitonin as a screening test for late-onset sepsis in preterm very low birth weight infants. *J Perinatol* 25:397-402.
11. Osorio-Caballero M, Perdigon-Palacio C, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera O, Olvera-Sanchez S, Morales-Mendez I, Sosa-Gonzalez I, Acevedo JF, Guzman-Grenfell AM, Molina-Hernandez A, Diaz NF, Flores-Herrera H. 2015. Escherichia coli-induced temporal and differential secretion of heat-shock protein 70 and interleukin-1beta by human fetal membranes in a two-compartment culture system. *Placenta* 36:262-9.
12. Alvarez-Cabrera MC, Barrientos-Galeana E, Barrera-Garcia A, Osorio-Caballero M, Acevedo JF, Flores-Herrera O, Diaz NF, Molina-Hernandez A,

- Garcia-Lopez G, Flores-Herrera H. 2018. Secretion of heat shock -60, -70 kD protein, IL-1beta and TNFalpha levels in serum of a term normal pregnancy and patients with pre-eclampsia development. *J Cell Mol Med* 22:5748-5752.
13. Reier-Nilsen T, Farstad T, Nakstad B, Lauvrak V, Steinbakk M. 2009. Comparison of broad range 16S rDNA PCR and conventional blood culture for diagnosis of sepsis in the newborn: a case control study. *BMC Pediatr* 9:5.
  14. Atreya MR, Wong HR. 2019. Precision medicine in pediatric sepsis. *Curr Opin Pediatr* 31:322-327.
  15. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. 2008. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet* 371:75-84.
  16. Romero R, Miranda J, Chaemsaihong P, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Dong Z, Ahmed AI, Shaman M, Lannaman K, Yoon BH, Hassan SS, Kim CJ, Korzeniewski SJ, Yeo L, Kim YM. 2015. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med* 28:1394-409.
  17. Denning TL, Bhatia AM, Kane AF, Patel RM, Denning PW. 2017. Pathogenesis of NEC: Role of the innate and adaptive immune response. *Semin Perinatol* 41:15-28.
  18. Patra A, Huang H, Bauer JA, Giannone PJ. 2017. Neurological consequences of systemic inflammation in the premature neonate. *Neural Regen Res* 12:890-896.
  19. Lawrence SM, Ruoss JL, Wynn JL. 2018. IL-17 in neonatal health and disease. *Am J Reprod Immunol* 79:e12800.
  20. Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, Filaninno A, De Giorgi E, Schettini F, Laforgia N, Ciccone MM. 2016. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *Pediatr Neonatol* 57:265-73.
  21. Mukhopadhyay S, Puopolo KM. 2012. Risk assessment in neonatal early onset sepsis. *Semin Perinatol* 36:408-15.
  22. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. 2014. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science* 345:760-5.
  23. Shin D, Song WO. 2015. Prepregnancy body mass index is an independent risk factor for gestational hypertension, gestational diabetes, preterm labor, and small- and large-for-gestational-age infants. *J Matern Fetal Neonatal Med* 28:1679-86.
  24. Walczak M. 1991. [Prematurity and intrauterine hypotrophy in the light of selected medical and socioeconomic factors among children's population in Szczecin]. *Ann Acad Med Stetin* 37:65-85.
  25. Gillespie SL, Anderson CM. 2018. Racial discrimination and leukocyte glucocorticoid sensitivity: Implications for birth timing. *Soc Sci Med* 216:114-123.

26. Bertagnolli M, Luu TM, Lewandowski AJ, Leeson P, Nuyt AM. 2016. Preterm Birth and Hypertension: Is There a Link? *Curr Hypertens Rep* 18:28.
27. Premkumar A, Henry DE, Moghadassi M, Nakagawa S, Norton ME. 2016. The interaction between maternal race/ethnicity and chronic hypertension on preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 215:787 e1-787 e8.
28. Lier MCI, Brosens IA, Mijatovic V, Habiba M, Benagiano G. 2017. Decidual Bleeding as a Cause of Spontaneous Hemoperitoneum in Pregnancy and Risk of Preterm Birth. *Gynecol Obstet Invest* 82:313-321.
29. Brown RG, Al-Memar M, Marchesi JR, Lee YS, Smith A, Chan D, Lewis H, Kindinger L, Terzidou V, Bourne T, Bennett PR, MacIntyre DA. 2019. Establishment of vaginal microbiota composition in early pregnancy and its association with subsequent preterm prelabor rupture of the fetal membranes. *Transl Res* 207:30-43.
30. Ronzoni S, Steckle V, D'Souza R, Murphy KE, Lye S, Shynlova O. 2018. Cytokine Changes in Maternal Peripheral Blood Correlate With Time-to-Delivery in Pregnancies Complicated by Premature Prelabor Rupture of the Membranes. *Reprod Sci* doi:10.1177/1933719118815590:1933719118815590.
31. Nadeau-Vallee M, Obari D, Quiniou C, Lubell WD, Olson DM, Girard S, Chemtob S. 2016. A critical role of interleukin-1 in preterm labor. *Cytokine Growth Factor Rev* 28:37-51.
32. Singh N, Herbert B, Sooranna GR, Orsi NM, Edey L, Dasgupta T, Sooranna SR, Yellon SM, Johnson MR. 2017. Is myometrial inflammation a cause or a consequence of term human labour? *J Endocrinol* 235:69-83.
33. Bedford Russell AR, Kumar R. 2015. Early onset neonatal sepsis: diagnostic dilemmas and practical management. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 100:F350-4.
34. Chauhan N, Tiwari S, Jain U. 2017. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. *Microb Pathog* 107:234-242.
35. Pammi M, Flores A, Versalovic J, Leeflang MM. 2017. Molecular assays for the diagnosis of sepsis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev* 2:CD011926.
36. Wynn JL, Wong HR, Shanley TP, Bizzarro MJ, Saiman L, Polin RA. 2014. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatr Crit Care Med* 15:523-8.
37. Kregel KC. 2002. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol* (1985) 92:2177-86.
38. Garsia RJ, Hellqvist L, Booth RJ, Radford AJ, Britton WJ, Astbury L, Trent RJ, Basten A. 1989. Homology of the 70-kilodalton antigens from

- Mycobacterium leprae and Mycobacterium bovis with the Mycobacterium tuberculosis 71-kilodalton antigen and with the conserved heat shock protein 70 of eucaryotes. *Infect Immun* 57:204-12.
39. Bausinger H, Lipsker D, Hanau D. 2002. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol* 23:342-3.
  40. Becker J, Craig EA. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem* 219:11-23.
  41. Stocki P, Dickinson AM. 2012. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. *Autoimmune Dis* 2012:617213.
  42. Tsan MF, Gao B. 2004. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol* 1:274-9.
  43. Charmpilas N, Kyriakakis E, Tavernarakis N. 2017. Small heat shock proteins in ageing and age-related diseases. *Cell Stress Chaperones* 22:481-492.
  44. De AK, Kodys KM, Yeh BS, Miller-Graziano C. 2000. Exaggerated human monocyte IL-10 concomitant to minimal TNF-alpha induction by heat-shock protein 27 (Hsp27) suggests Hsp27 is primarily an antiinflammatory stimulus. *J Immunol* 165:3951-8.
  45. Lechner P, Buck D, Sick L, Hemmer B, Multhoff G. 2018. Serum heat shock protein 70 levels as a biomarker for inflammatory processes in multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin* 4:2055217318767192.
  46. Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurtner D, Buchner J. 2005. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol* 12:842-6.
  47. van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E. 2001. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol* 8:1025-30.
  48. Basha E, O'Neill H, Vierling E. 2012. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci* 37:106-17.
  49. Velten M, Gomez-Vrielynck N, Chaffotte A, Ladjimi MM. 2002. Domain structure of the HSC70 cochaperone, HIP. *J Biol Chem* 277:259-66.
  50. Kiang JG, Tsokos GC. 1998. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther* 80:183-201.
  51. Pockley AG, Henderson B, Multhoff G. 2014. Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease. *Biochem Soc Trans* 42:1744-51.
  52. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. 2007. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol* 81:15-27.
  53. Shah M, Stanek J, Handwerger S. 1998. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *Histochem J* 30:509-18.

54. MacIntyre DA, Tyson EK, Read M, Smith R, Yeo G, Kwek K, Chan EC. 2008. Contraction in human myometrium is associated with changes in small heat shock proteins. *Endocrinology* 149:245-52.
55. Jordan I, Balaguer M, Esteban ME, Cambra FJ, Felipe A, Hernandez L, Alsina L, Molero M, Villaronga M, Esteban E. 2016. Glutamine effects on heat shock protein 70 and interleukines 6 and 10: Randomized trial of glutamine supplementation versus standard parenteral nutrition in critically ill children. *Clin Nutr* 35:34-40.
56. Marino LV, Pathan N, Meyer RW, Wright VJ, Habibi P. 2016. An in vitro model to consider the effect of 2 mM glutamine and KNK437 on endotoxin-stimulated release of heat shock protein 70 and inflammatory mediators. *Nutrition* 32:375-83.
57. Shi Y, Evans JE, Rock KL. 2003. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature* 425:516-21.
58. Boldenow E, Hogan KA, Chames MC, Aronoff DM, Xi C, Loch-Carusio R. 2015. Role of cytokine signaling in group B Streptococcus-stimulated expression of human beta defensin-2 in human extraplacental membranes. *Am J Reprod Immunol* 73:263-72.
59. Varrey A, Romero R, Panaitescu B, Miller D, Chaiworapongsa T, Patwardhan M, Faro J, Pacora P, Hassan SS, Hsu CD, Gomez-Lopez N. 2018. Human beta-defensin-1: A natural antimicrobial peptide present in amniotic fluid that is increased in spontaneous preterm labor with intra-amniotic infection. *Am J Reprod Immunol* 80:e13031.
60. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. 1999. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol* 162:3212-9.
61. Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda KH, Ishibashi T. 2013. IL-10 is significantly involved in HSP70-regulation of experimental subretinal fibrosis. *PLoS One* 8:e80288.
62. Wang W, Weng J, Yu L, Huang Q, Jiang Y, Guo X. 2018. Role of TLR4-p38 MAPK-Hsp27 signal pathway in LPS-induced pulmonary epithelial hyperpermeability. *BMC Pulm Med* 18:178.
63. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK. 2002. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem* 277:15028-34.
64. Wilhide ME, Tranter M, Ren X, Chen J, Sartor MA, Medvedovic M, Jones WK. 2011. Identification of a NF-kappaB cardioprotective gene program: NF-kappaB regulation of Hsp70.1 contributes to cardioprotection after permanent coronary occlusion. *J Mol Cell Cardiol* 51:82-9.

65. Giuliano JS, Jr., Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. 2011. Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. *Open Inflamm J* 4:49-60.
66. Alder MN, Lindsell CJ, Wong HR. 2014. The pediatric sepsis biomarker risk model: potential implications for sepsis therapy and biology. *Expert Rev Anti Infect Ther* 12:809-16.
67. He Y, Du WX, Jiang HY, Ai Q, Feng J, Liu Z, Yu JL. 2017. Multiplex Cytokine Profiling Identifies Interleukin-27 as a Novel Biomarker For Neonatal Early Onset Sepsis. *Shock* 47:140-147.
68. Papadopoulos P, Pistiki A, Theodorakopoulou M, Christodouloupoulou T, Damoraki G, Goukos D, Briassouli E, Dimopoulou I, Armaganidis A, Nanas S, Briassoulis G, Tsiodras S. 2017. Immunoparalysis: Clinical and immunological associations in SIRS and severe sepsis patients. *Cytokine* 92:83-92.
69. Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. 2015. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones* 20:885-92.
70. Wheeler DS, Fisher LE, Jr., Catravas JD, Jacobs BR, Carcillo JA, Wong HR. 2005. Extracellular hsp70 levels in children with septic shock. *Pediatr Crit Care Med* 6:308-11.
71. El-Gamasy MA, El-Sadek AE, Fakhreldin AR, Kamel A, Elbehery EG. 2018. Heat shock protein 60 as a biomarker for acute kidney injury secondary to septic shock in pediatric patients, Egyptian multicenter experience. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 29:852-862.
72. Wheeler DS, Lahni P, Odoms K, Jacobs BR, Carcillo JA, Doughty LA, Wong HR. 2007. Extracellular heat shock protein 60 (Hsp60) levels in children with septic shock. *Inflamm Res* 56:216-9.
73. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. 2018. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med* 6:223-230.

ANEXO 1  
Carta de Institucional



Instituto Nacional de Perinatología  
Isidro Espinosa de los Reyes

Dirección General

México, D.F., a 5 de diciembre de 2013

"2013, Año de la Lealtad Institucional y  
Centenario del Ejército Mexicano"

2013.1000 - 000905

**M. en C. Héctor Flores Herrera**  
**Investigador en Ciencias Médicas "C"**  
**Departamento de Inmunobiología**  
**Presente.**

Me es grato informar a usted y a su grupo de colaboradores que el Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación han revisado y emitido el dictamen correspondiente a su proyecto:

**Identificación de las bacterias patógenas comúnmente asociadas a la sepsis neonatal mediante la amplificación de la región variable 16S rDNA en combinación con la electroforesis en geles desnaturalizantes**

**ACEPTADO**

**Registro: 212250-3210101**

En cuanto al monto económico solicitado por usted para desarrollar el proyecto mencionado, la asignación dependerá estrictamente de la disponibilidad de los recursos fiscales correspondientes y, en su caso, de la disponibilidad de los recursos entregados por agencias financiadoras externas.

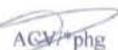
Me permito hacer de su conocimiento que, durante el desarrollo de este proyecto, usted deberá entregar informes trimestrales y al concluir el mismo un **informe técnico final**, según el formato institucional disponible en: [www.inper.mx/investigacion.html](http://www.inper.mx/investigacion.html), para la presentación de productos de investigación, acompañado de los documentos probatorios del mismo.

Le felicito por su desempeño y compromiso institucional y me es grato enviarle un atento saludo.

Atentamente,

  
**DR. JAVIER MANCILLA RAMÍREZ**  
DIRECTOR GENERAL

c.c.p.- Dr. Arturo Cébulo Vázquez.- Director de Investigación  
C.P. Gabriel Vázquez Sierra.- Jefe del Departamento de Contabilidad  
y Responsable de la Unidad Contable de Proyectos, INPer

  
ACV/phg

## ANEXO 2

### Consentimiento informado



INSTITUTO  
NACIONAL DE  
PERINATOLOGÍA  
Isidro Espinosa de los Reyes

#### DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN SOLICITUD DE EVALUACIÓN Y REGISTRO DE PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

---

#### TEXTO DECLARATORIO

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO

Estimada señora:

Quisiéramos informarle que en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de este Instituto se está llevando a cabo el estudio denominado

**IDENTIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS PATOGENAS COMUNMENTE ASOCIADAS A LA SEPSIS NEONATAL MEDIANTE LA AMPLIFICACIÓN DE LA REGIÓN VARIABLE DEL 16S rDNA EN COMBINACIÓN CON LA ELECTROFORESIS EN GELES DESNATURALIZANTES.**

La infección neonatal presenta fiebre, decaimiento físico y falta de apetito las cuales son producidas por diferentes bacterias.

El principal objetivo de este estudio es detectar en la sangre de su bebe a las bacterias causantes de infección.

El estudio consiste en

1. Al momento en que a su hijo(a) se manifieste la sintomatología de infección se le limpiará la zona del antebrazo de su bebe para la toma de una muestra de sangre, la cual será realizado por el personal médico responsable y no representa ningún riesgo para su bebe.
2. La muestra será analizada en el departamento infectología e inmunología y en el departamento de la subdirección biomédica de este Instituto. La sangre únicamente será usada para la detección de las bacterias que están causando los síntomas de infección en su bebe.
3. La detección de las bacterias causantes de la infección permitirá proporcionarle una mejor atención terapéutica a su bebe.

Su participación en este estudio permitiría contribuir en forma importante a la identificación de las bacterias causantes de la infección en su bebé. Nos permitimos invitarla a usted a participar en este estudio, aclarándole que en caso de que usted no acepta participar, **no tendrá ninguna repercusión** en la atención de usted o de su hijo(a) en el Instituto, ni en el costo de la atención médica que ambos reciban. Uno de los beneficios es que este estudio no producirá **ningún costo adicional**, así mismo, le informamos que a usted no se le pagará por la participación de su bebe en el estudio.

La información que se obtenga del estudio será estrictamente confidencial y será usada sólo para fines de investigación, así mismo le informamos que nunca serán utilizados con fines diferentes para la que han sido proporcionados.

Las preguntas que considere necesarias para aclarar todas sus dudas las puede externar con el M en C. C Héctor Flores Herrera al teléfono 55 20 99 00 Ext 346 de Lunes a Viernes de 8:00 am a 4:00 pm. También en será atendida vía correo electrónico en la dirección [floresh8@yahoo.com](mailto:floresh8@yahoo.com)



DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN  
SOLICITUD DE EVALUACIÓN Y REGISTRO DE  
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

YO \_\_\_\_\_  
(Nombre del participante o de su representante legal)

Declaro libremente que estoy de acuerdo en participar (en que participe mi representado cuyo nombre aparece abajo) en esta investigación cuyo objetivo, procedimientos, beneficios, y riesgos se especifican en el Apartado A de este documento.

Es de mi conocimiento que los investigadores me han ofrecido aclarar cualquier duda o contestar cualquier pregunta que, al momento de firmar la presente, no hubiese expresado o que surja durante el desarrollo de la investigación.

Se me ha manifestado que puedo retirar mi consentimiento de participar en cualquier momento sin que ello signifique que la atención médica que se me proporcione, se vea afectada por este hecho.

En el caso que yo decida retirarlo, deberán seguir las siguientes indicaciones:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Se me ha informado que el participar en este estudio no repercutirá en el costo de la atención médica que se me deba brindar y que toda la información que se otorgue sobre mi (su) identidad y participación será confidencial, excepto cuando yo lo autorice.

Para los fines que se estime conveniente, firmo la presente junto al investigador que me informó y dos testigos, conservando una copia de a) Consentimiento informado y b) Información proporcionada para obtener mi autorización.

México D.F. a \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_.

	NOMBRE	FIRMA
PARTICIPANTE		
REPRESENTANTE		
INVESTIGADOR		
TESTIGO		
TESTIGO		