



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA  
ISIDRO ESPINOSA DE LOS REYES**

**PERFIL DE LA SECRECIÓN DE PROTEÍNAS DE CHOQUE  
TÉRMICO Y DE IL-1b EN NEONATOS PREMATUROS CON  
EVIDENCIA CLÍNICA DE SEPSIS**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**ESPECIALISTA EN NEONATOLOGÍA**

**P R E S E N T A**

**GIBRÁN ZÚÑIGA GONZÁLEZ**

**DIRECTOR DE TESIS**

**M en C. HÉCTOR FLORES HERRERA**

Departamento de Inmunobiología  
INSTITUTO NACIONAL DE PERINATOLOGÍA



Ciudad de México, 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.

## AUTORIZACIÓN DE TESIS

Título de tesis

**Perfil de la secreción de proteínas de choque térmico y de IL-1b en neonatos prematuros con evidencias clínicas de sepsis**



**Dra. VIRIDIANA GORBEA CHÁVEZ**

Directora de Educación en Ciencias de la Salud.  
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



**Dra. IRMA ALEJANDRA CORONADO ZARCO**

Profesora titular del Curso de Especialización en Neonatología.  
Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes"



**M. en C. HÉCTOR FLORES HERRERA**

Director de Tesis y Asesor Metodológico  
Departamento de Inmunobioquímica  
Instituto Nacional de Perinatología  
"Isidro Espinosa de los Reyes"

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, Dr. Alberto Zuñiga y Dra. Lorena González, quienes despertaron en mí el amor por la ciencia y la medicina. A mis hermanos Nayeli, Irán e Irving, quienes me alentaron a seguir adelante. A mis abuelos Alfredo González e Hilda Escobar, de quienes recibí amor incondicional. A mi sobrina Aria, que con su alegría me hizo enamorarme aún más de mi profesión.

## **AGRADECIMIENTO**

Este trabajo se desarrolló con fondos federales al Instituto Nacional de Perinatología "*Isidro Espinosa de los Reyes*" mediante el proyecto de investigación con número de registro 212250-3210101 otorgado a HFH.

## INFORMACIÓN DE LOS AUTORES

### Gibrán Zúñiga González

Médico Residente

Especialidad de Neonatología

Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes".

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11000.

Ciudad de México, México

Correo electrónico: gibzugo@hotmail.com

Contribución y aportaciones del autor en el desarrollo del presente trabajo

1) identificación y obtención de la sangre de los recién nacidos sanos a término y de los recién nacidos con datos clínicos de sepsis; 2) cuantifico la Hsp-27, -60 y del TNF $\alpha$  en los recién nacidos; 3) participo en la escritura del trabajo presentado en el XX Congreso Nacional de Neonatología, Mazatlán 2019, ; 4) escritura de la tesis.

### Héctor Flores Herrera

Investigador en Ciencias Médicas nivel C

Miembro del Sistema Nacional de Investigadores nivel 1

Departamento de Inmunobioquímica

Instituto Nacional de Perinatología "Isidro Espinosa de los Reyes".

Montes Urales 800, Colonia Lomas de Virreyes, 11000.

Ciudad de México, México

5520 9900 extensión

Correo electrónico: h.flores@inper.gob.mx

Contribución y aportaciones del autor en el desarrollo del presente trabajo

1) diseño y ejecución experimental; 2) asesoramiento para la cuantificación de la Hsp-27, -60 y del TNF $\alpha$  mediante el ensayo de ELISA; 3) estructuro el resumen que fue presentado en el XX Congreso Nacional de Neonatología, Mazatlán 2019; 4) revision de la tesis; 5) obtención del financiamiento para el desarrollo del presente trabajo.

# INDICE

	<i>Página</i>
RESUMEN .....	8
ABSTRACT .....	9
1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. ANTECEDENTES	
2.1. <i>Epidemiología de la sepsis neonatal</i> .....	13
2.2. <i>Clasificación</i> .....	13
2.3. <i>Manifestaciones clínicas</i> .....	14
2.4. <i>Marcadores para el diagnóstico de sepsis neonatal</i> .....	14
2.5. <i>Proteínas de choque térmico</i> .....	17
2.6. <i>Relación de las Hsp y la respuesta inflamatoria</i> .....	17
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	24
4. JUSTIFICACIÓN .....	26
5. OBJETIVO GENERAL .....	27
6. <i>Objetivos particulares</i> .....	27
6. MATERIAL Y MÉTODOS	
6.1. <i>Aspectos éticos</i> .....	29
6.2. <i>Universo de los pacientes</i> .....	29
6.2.1. <i>Criterios de inclusión</i> .....	29
6.2.2. <i>Criterios de exclusión</i> .....	29
6.2.3. <i>Criterios de eliminación</i> .....	29
6.2.4. <i>Variables de estudio</i> .....	29
6.3. <i>Procedimiento</i> .....	30
6.4. <i>Obtención de las muestras</i> .....	30
6.5. <i>Determinación de la Hsp-27 y -60</i> .....	30
6.6. <i>Determinación del TNF<math>\alpha</math></i> .....	30
6.7. <i>Análisis estadístico</i> .....	30

7. RESULTADOS	
7.1. Datos epidemiológicos	32
7.2. Cuantificación de las Hsp	32
7.3. Cuantificación del TNF $\alpha$	32
8. DISCUSIÓN	35
9. CONCLUSIONES	37
10. REFERENCIAS	37
11. PRODUCTOS DERIVADOS DEL PRESENTE ESTUDIO	43

*Página*

TABLAS

1. Marcadores de laboratorio en el diagnóstico de sepsis neonatal temprana	16
2. Características maternas y neonatales	32
3. Diagnóstico clínico de los neonatos con sepsis	33
4. Cuantificación de las Hsp en el suero de los neonatos	34

FIGURAS

1. Estructura de las Hsp pequeñas	18
2. Estructura de las Hsp grandes	20
3. Interacción de las Hsp y la respuesta inflamatoria	36

ANEXOS

1. Carta institucional	43
2. Consentimiento informado	43

## RESUMEN

**Introducción** A nivel mundial la sepsis en neonatos es una de las primeras causas morbilidad y mortalidad neonatal. 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 neonatos sanos a término y de neonatos con evidencias clínicas de sepsis. el principal objetivo del presente estudio fue cuantificar la expresión de las proteínas de choque térmico Hsp-27, -60 y del TNF $\alpha$  en pacientes neonatos diagnosticadas con septicemia.

**Material y métodos** El suero de recién nacidos sanos a término (n=23) y de recién nacidos con evidencias clínicas de sepsis (n=12) fueron analizados para la cuantificación de las Hsp-27, -60 y del factor de necrosis tumoral tipo alfa (TNF $\alpha$ ) mediante el ensayo de ELISA.

**Resultados** La edad de los recién nacidos con sepsis disminuyó significativamente 1.1-veces con respecto a los recién nacidos sanos a término ( $38.6 \pm 1.1$  semanas;  $p \leq 0.001$ ). El peso de los recién nacidos con sepsis disminuyó 1.4-veces con respecto a los recién nacidos sanos ( $p = 0.006$ ; tabla 3).

En el 33.3 % (4/12) se detectó el crecimiento de *E. coli* (1 caso, M2); *E. epidermidis* (2 casos, M6, y M7) y *S. dysgalactiae* (1 caso, M9). En el 66.6% de las muestras analizadas no se aislaron bacterias (tabla 4). En el 33.3% de los casos, las pacientes desarrollaron datos clínicos de corioamnionitis (M1, M2, M4, y M11), en tanto que la ruptura de las membranas fetales se presentó en el 25.0% (M1, M2, M4, y M12). En el 8.3% se presentó simultáneamente datos clínicos de corioamnionitis y ruptura prematura de las membranas fetales (M4). De las pacientes en las que los recién nacidos desarrollaron datos clínicos de sepsis, el 25.0% presentaron datos de clínicos de preeclampsia (M5, M8, y M9) de las cuales el 16.6% tuvieron preeclampsia severa (M5, y M8) y el 8.3% de los recién nacidos presentó restricción del crecimiento intrauterino (M5; tabla 4).

La concentración de la Hsp-27 en los neonatos sanos fue de  $0.045 \pm 0.024$  pg/mL la cual disminuyó significativamente 2.5-veces con respecto a los neonatos con sepsis ( $p = 0.004$ ; tabla 5). La concentración de la Hsp-60 en los neonatos sanos fue de  $13.69 \pm 5.3$  pg/mL la cual aumentó significativamente 1.7-veces con respecto a los neonatos con sepsis ( $p \leq 0.001$ ; tabla 5). La concentración del TNF $\alpha$  en los neonatos sanos fue de  $2.94 \pm 0.46$  pg/mL la cual aumentó significativamente 3.0-veces con respecto a los neonatos con sepsis ( $p \leq 0.001$ ; tabla 5).

**Discusión** Se ha demostrado que la Hsp-27 tiene efectos anti-inflamatorio en tanto que la Hsp-60 tienen efecto pro-inflamatorias. Nuestros resultados demuestran variaciones significativas de estas Hsp en los neonatos con evidencias de sepsis con respecto a los neonatos sanos lo que demuestra el aumento significativo del TNF $\alpha$  en los recién nacidos con evidencias de sepsis.

**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 modula de manera diferencial la expresión de las HSP como en el caso de los neonatos sanos a término con trabajo de parto activo.

**Palabras clave** proteínas de choque térmico; respuesta inflamatoria; sepsis neonatal

## ABSTRACT

**Introduction.** On a world level the sepsis on neonates is one of the first causes of neonatal morbidity and mortality. The heat shock proteins (Hsp) have been associated as regulatory molecules to the inflammatory response. The main objective of the present study was to determinate the concentration of HSP-27, -60 y -70 in the serum of healthy neonates and neonates with clinical evidence of sepsis. Also, other objective was to quantify the expression of proteins of heat shock HSP-27, -60 y del TNF $\alpha$  in neonates patient diagnosed with septicemia.

**Material and method.** The serum of healthy term newborns (n=23) and of newborns with clinic evidence of sepsis (n=12) were analyzed for the quantification of the Hsp-27, -60 and the tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) by the ELISA assay.

**Results.** The age of the newborns with sepsis decrease significantly 1.1 times respect to the healthy term newborns ( $38.6 \pm 1.1$  weeks;  $p \leq 0.001$ ). the weight of the newborns with sepsis decrease 1.4 times respect to the rest of the healthy newborns ( $p = 0.006$ ; table 3).

In the 33.3% (4/12) the grown of the E. coli was detected (1 case, M2); E. epidermidis (2 cases, M6 y M7) and S. dysgalactiae (1 case, M9). In 66.6% of the samples analyzed, no bacteria were isolated (table 4). In 33.3% of the cases, the patients developed clinical data of chorioamnionitis (M1, M2, M4, and M11), while the rupture of the fetal membranes occurred in 25.0% (M1, M2, M4, and M12). In 8.3%, clinical data of chorioamnionitis and premature rupture of the fetal membranes (M4) was simultaneously presented. Of the patients in whom the newborns developed clinical data of sepsis, 25.0% presented data of clinicians of preeclampsia (M5, M8, and M9) of which 16.6% had severe preeclampsia (M5, and M8) and 8.3 % of newborns showed intrauterine growth restriction (M5, table 4).

The concentration of Hsp-27 on healthy neonates was of  $0.045 \pm 0.024$  pg/mL, which decreased significantly 2.5 times with respect to neonates with sepsis ( $p = 0.004$ , table 5). The concentration of HSP-60 in healthy neonates was  $13.69 \pm 5.3$  pg / ml, which increased significantly 1.7 times with respect to neonates with sepsis ( $p \leq 0.001$ , table 5). The concentration of TNF $\alpha$  in healthy neonates was  $2.94 \pm 0.46$  pg / ml, which increased significantly 3.0 times with respect to neonates with sepsis ( $p \leq 0.001$ , table 5).

**Discussion.** It has been shown that Hsp-27 has anti-inflammatory effects while HSP-60 has a pro-inflammatory effect. Our results show significant variations of these HSP in neonates with evidence of sepsis with respect to healthy neonates, which demonstrates the significant increase of TNF $\alpha$  in newborns with evidence of sepsis.

**Conclusions.** With these results we demonstrate that it is feasible to quantify Hsp in the serum of newborns and that the development of sepsis in newborns differentially modulates the expression of Hsp as in the case of healthy full-term neonates with work of active labor.

**Keywords** heat shock proteins; inflammatory response; neonatal sepsis.

1.

## 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 procesos infecciosos (11), así como en otras patologías obstétricas (12). En el presente estudio evaluamos la concentración de la HSP-27, -60 y del TNF $\alpha$  en recién nacidos sanos a término y en recién nacidos prematuros con sepsis.

## 2.0 ANTECEDENTES

### 2.1 *Epidemiología de la sepsis neonatal*

La mortalidad neonatal se reconoce cada vez más como un importante desafío de salud pública mundial que debe abordarse si queremos reducir las disparidades de salud infantil entre los países ricos y pobres. La mayoría de los 4 millones de muertes neonatales estimadas por año se producen en países de ingresos bajos y medios (13).

A nivel mundial se estima que 48 niños por 100 000 habitantes desarrollan sepsis, 22 niños por 100 000 habitantes desarrollan sepsis grave y 2202 neonatos por 100 000 nacidos vivos desarrollan sepsis neonatal, con una mortalidad de 11 a 19%. Esto se traduciría en una incidencia de 3, 0 millones de casos de sepsis neonatal y 1, 2 millones de casos de sepsis pediátrica por año. Estas estimaciones son exploratorias debido a la considerable heterogeneidad entre los datos y la falta de datos basados en la población de entornos de ingresos bajos y medios (14).

En México, Una de cada cinco defunciones sucede el primer día de vida, y una de cada cuatro entre el primer día de vida y el sexto. Los fallecimientos registrados el primer día de vida se deben a problemas relacionados fundamentalmente con dificultad respiratoria del recién nacido, inmadurez de los productos, problemas durante el parto y anomalías congénitas. Durante la primera semana se mezclan con las causas antes mencionadas las infecciones del recién nacido como la sepsis bacteriana o la neumonía congénita. Al rebasar la semana de vida, la sepsis bacteriana domina el perfil y le siguen en importancia los problemas respiratorios debidos a inmadurez de los recién nacidos. La incidencia de sepsis neonatal en México se ha reportado de 4 a 15.4 casos por 1 000 nacidos vivos. Datos de Estados Unidos de América (EUA) mencionan tasas de incidencia de 1-5 casos por 1 000 nacidos vivos.

## *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, 15); 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, 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 (16, 17); 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 (18, 19), los defectos de los genes inmunorreguladores y la prematurez se asocian con una incompleta maduración y/o función del sistema inmune innat (20); 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, pulmón húmedo, sufrimiento fetal, anemia, hemorragia intraventricular, hipotermia y trastornos metabólicos (21, 22).

Diversas son las causas maternas atribuibles a los nacimientos prematuros (23), identificándose a la obesidad (24), nivel socioeconómico (25), y la etnia (26), problemas hipertensivos (27, 28), distenciones uterinas, hemorragia de la decidua (29), 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 (30, 31) y/o la activación del trabajo de parto (32, 33).

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* (21).

### *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 (21-23).

### *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 (22, 34). 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 (35, 36). 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 (37).

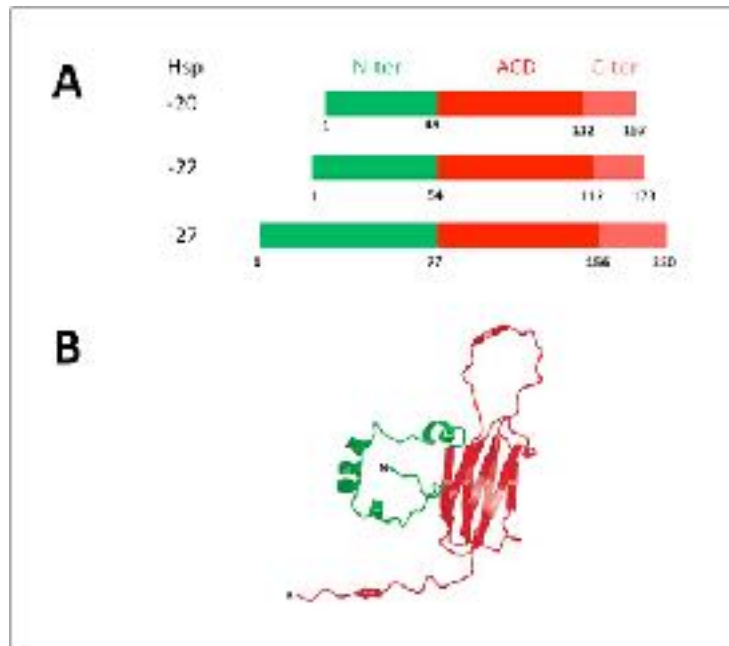
## 5. *Proteínas de choque térmico*

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 de tolerancia al calor (38). Las Hsp son moléculas pequeñas de 20 a 100 Kilo Daltones (KDa) se encuentran ampliamente conservadas y se expresan en plantas, animales, y bacterias (39). Las principales funciones biológicas se encuentra la homeostasis celular (40), 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 (41), y recientemente han sido asociadas con la respuesta inmunológica (42, 43).

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 (44) con propiedades anti y pro inflamatorias respectivamente (45, 46).

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 (47).

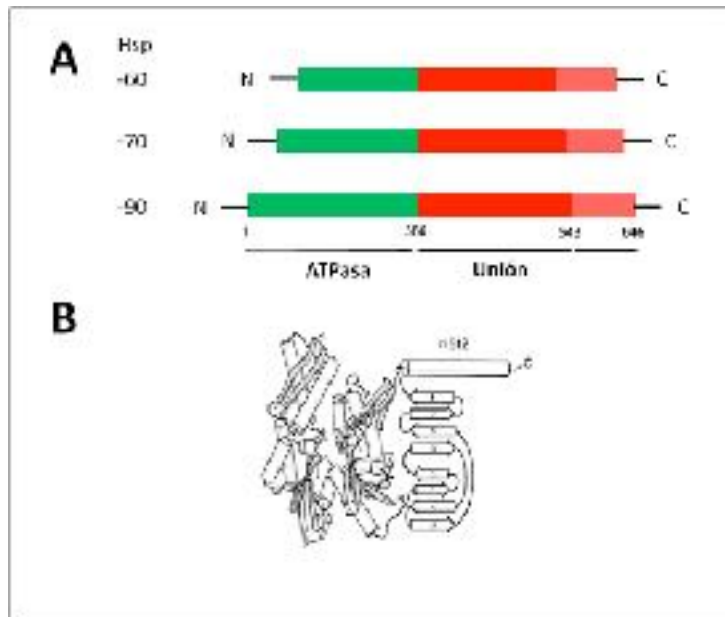


**Figura 1 Estructura de las HSP pequeñas. (A)** Dominios N-terminal (N-ter; verde),  $\alpha$ -cristalino (ACD; rojo), C-terminal (C-ter; rosa). **(B)** Estructura secundaria se observa los diferentes dominios de las hojas alfa y beta. Imagen tomada de van Montfort y cols., (48)

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) (49). 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) (48).

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 (48-50).



**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., (51)

Las Hsp son proteínas altamente conservadas y se encuentran localizadas en el núcleo, citoplasma, membrana plasmática y en diferentes fluidos biológicos (52, 53). Diferentes evidencias han demostrado que las Hsp se encuentran en células de la decidua (54), placenta (52, 53), cordón umbilical (55), miometrio (55), y en sangre de neonatos y niños pediátricos en unidades de cuidados intensivos (56, 57).

### 2.6 Relación de las Hsp y la respuesta inflamatoria

Dentro del sistema de alarma celular temprana se encuentran las Hsp (58), y las proteínas de tipo  $\beta$ -defensinas (59, 60) 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 (61).

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, (45, 62) 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 (61).

Las propiedades antiinflamatorias de Hsp-27 pueden ser utilizadas para diversos tratamientos asociados a procesos de enfermedades inflamatorias (63). 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 (45). 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 (45). 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 (64, 65).

La proteína de choque térmico 70 (Hsp70) 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, Hsp70 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 Hsp70 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 gran-negativas y se ha demostrado el incremento en la expresión de la Hsp70 y la secreción de diversas citocinas asociadas a la respuesta inflamatoria. La Hsp70 puede activar y desactivar las vías de señalización NF-k $\beta$  y MAPK, mediando una respuesta pro o antiinflamatoria al estrés. La Hsp70 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 Hsp70 (57, 66). Adicionalmente, la expresión de Hsp70 puede ser estimulada por la fiebre y existen correlaciones positivas entre los niveles séricos de HSP70 y varios marcadores de inflamación. Los niveles séricos de Hsp70 también experimentan aumentos significativos con grados de inflamación cada vez mayores, además, el aumento de los niveles séricos de Hsp70 se ha asociado con la mortalidad por sepsis (57, 67-69).

Se ha demostrado que la proteína de choque térmico extracelular 60 (Hsp60) actúa como potente estimulador de las respuestas inmunitarias. Cuando se libera en el medio extracelular, la Hsp60 aumenta los niveles de células CD4 + CD25 y suprime los linfocitos T citotóxicos. El aumento de la expresión de la superficie celular de HSP60 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 Hsp60 extracelular pueden desempeñar un papel importante en la respuesta del huésped a la sepsis. Se ha reportado que los niveles plasmáticos de Hsp60 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. Hsp60 tuvo una alta validez para la predicción de casos de LRA con choque séptico. Por lo tanto, la HSP60 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 (66, 68, 69).

La Hsp27 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 Hsp27 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 (45, 66).

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 (14).

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 tremendo 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 (37).

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 (14).

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 incremento 2 veces más altas en países de bajos ingresos con respecto a los países desarrollados (1, 3, 34). 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 (68, 70). 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 (34).

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 (68, 70). 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 (70).

En los pacientes pediátricos existen estudios que han demostrado que las proteínas de choque térmico (HSP) pueden ser marcadores tempranos (69-71); 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. OBJETIVO GENERAL**

Cuantificar la expresión de las proteínas de choque térmico Hsp-27, -60 y del TNF $\alpha$  en pacientes neonatos diagnosticados con septicemia.

### *5.1 Objetivos particulares*

1. Cuantificar la expresión de la Hsp-27, -60 y del TNF $\alpha$  en neonatos con septicemia mediante el ensayo de ELISA
2. Cuantificar la expresión de la Hsp-27, -60 y del TNF $\alpha$  en neonatos sanos a térmico mediante el ensayo de ELISA.
3. Comparar la concentración de la Hsp-27, -60 y del TNF $\alpha$  entre los neonatos con septicemia y los neonatos sanos a término.

## 6.0 MATERIALES Y MÉTODOS



Procedimiento general del estudio. La toma de las muestras de sangre de los recién nacidos se efectuó en la unidad de cuidados intermedios del recién nacido (UCIREN), el análisis microbiológico se determinó en el departamento de Microbiología y el desarrollo experimental se realizó en el departamento de Inmunobiología.

### 6.1 Aspectos éticos

Previo a la obtención de la sangre se obtuvo el consentimiento informado de las pacientes en donde se les explicó la finalidad del proyecto de investigación, el cual fue aprobado por los comités de investigación y ética institucionales y cuenta con número de registro institucional 212250-3210101 (anexo 1). Se les informó que la obtención de la sangre sería tomada por el médico especialista (GZG) después del nacimiento de su bebé y que este procedimiento no afectaría con el bienestar de ella ni el de su bebé. Finalmente, se le entregó la carta de consentimiento informado para que la paciente firmará de manera libre (anexo 2).

## 6.2 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 prematuros con sepsis neonatal con y sin hemocultivo positivo; y 2) recién nacidos sanos a término.

### 6.2.1 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

### 6.2.2 Criterios de exclusión

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

### 6.2.3 Criterios de eliminación

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

## 6.3 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/μg, en el suero de recién nacidos prematuros con sepsis y a término sanos.

#### *6.4 Procedimiento*

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.

#### *6.5 Obtención de las muestras*

Se obtendrán 0.5 mL de sangre periférica de neonatos con evidencias sugestivas de sepsis de los grupos de estudio. Posteriormente, las muestras serán centrifugadas a 1500 rpm por 15 min, y se obtendrá el plasma. Finalmente, el plasma será almacenado a -80°C hasta la cuantificación de las Hsps.

#### *6.6 Determinación de la Hsp-27 y -60*

La determinación de la Hsp-27 (DYC-1580), y de la Hsp-60 (DYC-1800-5) se realizó mediante el ensayo de ELISA con las recomendaciones de la casa comercial (R&D System) y como ha sido publicado por nuestro grupo de investigación [Osorio-Caballero, 2015].

La preparación de las microplacas (Nunc-Immuno Brand products, Denmark) consistió en la adición del anticuerpo de captura para la Hsp-27 (3.0 μg/mL) y para la Hsp-60 (2.0 μg/mL) las cuales fueron selladas con membrana adhesiva (SealPleat; EXCEL Scientific) y fueron incubadas a temperatura ambiente toda la noche a 4°C. Al finalizar la incubación la placa fue lavada tres veces con solución de lavado que contiene Tween-20 al 0.05% en PBS (TPBS, pH 7.2).

A cada pozo de la placa se le añadieron 300  $\mu$ L de solución bloqueadora (0.1% BSA, 0.05 %  $\text{NaN}_3$ , PBS pH 7.2) y fue incubada por 2 horas a temperatura ambiente. Al terminar la incubación, la placa fue lavada nuevamente con la solución de PBS.

La curva estándar para cada placa fue de 7 puntos con diluciones seriadas (2-veces) consistiendo de la Hsp-27 (31.3 a 2,000 pg/mL) y para la Hsp-60 (0.625 a 40 ng/mL). En el resto de los pozos de la placa se colocaron 100  $\mu$ L de cada una de las muestras de los diferentes procedimientos experimentales. La placa fue incubada por dos horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se le adicionaron 100  $\mu$ L por pozo del anticuerpo de detección Hsp-60 (100 ng/mL), se incubó nuevamente por dos horas a temperatura ambiente. La placa fue lavada dos veces, y posteriormente se adicionaron 100  $\mu$ L por pozo de estreptavidina-HRP e incubadas nuevamente a temperatura ambiente por 20 minutos y en oscuridad. La placa fue lavada con TPBSA, se le adicionaron 100  $\mu$ L por pozo de la mezcla 1:1 del sustrato colorimétrico (R&D; DY999) que consiste en el reactivo A ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y B (tetrametilbenzidina), la placa fue incubada por 20 minutos. La reacción fue detenida mediante la adición de 50  $\mu$ L por pozo de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. La placa fue leída a 450 nm (Dynatech MR5000). Los resultados fueron expresados en pg/mL.

### *6.7 Determinación del TNF $\alpha$*

La determinación de la TNF $\alpha$  (DY201; R&D Systems) se realizó mediante el ensayo de ELISA con las recomendaciones de la casa comercial (R&D System) y como ha sido publicado por nuestro grupo de investigación [Alvarez-Cabrera 2018].

La preparación de la microplaca se realizó como ha sido descrita previamente (*ver sección 6.6*) la adición del anticuerpo de captura fue de (4.0  $\mu$ g/mL) y la curva estándar fue de 15.0 a 960 pg/mL. Finalmente se añadieron a cada pozo 50  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (2N) para detener la reacción. Se determinó la densidad óptica a una longitud de 450 nm. Los resultados fueron expresados en unidades de pg/mL.

### *6.8 Análisis estadístico*

Los datos fueron analizados mediante la prueba de varianza (ANOVA). La comparación post hoc fue realizada mediante la medición de Tukey. Se usó el software de SigmaPlot (versión 11.0, USA). Todos los valores son presentados como la media  $\pm$  error estándar. Se tomó como diferencia estadísticamente significativa el valor menor a  $p=0.05$ . En cada caso las mediciones se realizaron por duplicado

## 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 sanos a término ( $n = 23$ ) y neonatos con evidencias clínicas de sepsis ( $n = 12$ ). La tabla 2 muestra las características maternas y neonatales entre los grupos de estudio.

**Tabla 2** Características maternas y neonatales

	Sanos a término	Sepsis	$p$
<b>VARIABLES MATERNAS</b>			
edad gestacional (SDG)	38.6±1.1	33.5±3.0	≤0.001
<b>VARIABLES NEONATALES</b>			
peso (g)	2,970.5±441	2,109.6±1,156	=0.006

(SDG) semanas de gestación; (g) gramos. Los datos se presentan como la media ± DE.

La edad de los recién nacidos con sepsis disminuyó significativamente 1.1-veces con respecto a los recién nacidos sanos a término (38.6±1.1 semanas;  $p \leq 0.001$ ). El peso de los recién nacidos con sepsis disminuyó 1.4-veces con respecto a los recién nacidos sanos ( $p = 0.006$ ; tabla 2).

La tabla 3 muestra las bacterias detectadas y el diagnóstico materno de los neonatos con evidencias sugestivas de sepsis. En el 33.3 % (4/12) se detectó el crecimiento de microorganismos: *E. coli* (1 caso, M2); *E. epidermidis* (2 casos, M6, y M7) y *S. dysgalactiae* (1 caso, M9). En el 66.6% de las muestras analizadas no se aislaron bacterias (tabla 4).

**Tabla 3** Diagnóstico clínico de los neonatos con sepsis.

Muestra	E d a d gestacional (semanas)	Sexo	Peso (g)	Microorganismo	Diagnóstico clínico materno
1	32	F	3302	ND	CAM
2	33	F	1170	<i>E. coli</i>	CAM
3	31	F	1060	ND	7 días de RPMF
4	34	M	2485	ND	8 días de RPMF, sin datos de CAM
5	30	F	1300	ND	PE severa y RCIU
6	39	F	4855	<i>E. epidermidis</i>	Sin datos clínicos de patologías
7	35	M	1245	<i>E. epidermidis</i>	Sin datos clínicos de patologías
8	28	M	1085	ND	PE severa
9	37	M	2700	<i>S. dysgalactiae</i>	PE
10	39	F	2640	ND	Sin datos clínicos de patologías
11	30	F	1380	ND	CAM
12	33	M	2094	ND	2 días de RPMF

F; femenino, M; masculino, ND; no detectado, CAM; corioamnionitis, RPM; ruptura prematura de las membranas fetales; RCIU, restricción del crecimiento intrauterino.

En el 33.3% de los casos, las pacientes desarrollaron datos clínicos de corioamnionitis (M1, M2, M4, y M11), en tanto que la ruptura de las membranas fetales se presentó en el 25.0% (M1, M2, M4, y M12). En el 8.3% se presentó simultáneamente datos clínicos de corioamnionitis y ruptura prematura de las membranas fetales (M4). De las pacientes en las que los recién nacidos desarrollaron datos clínicos de sepsis, el 25.0% presentaron datos de clínicos de preeclampsia (M5, M8, y M9) de las cuales el 16.6% tuvieron preeclampsia severa (M5, y M8) y el 8.3% de los recién nacidos presento restricción del crecimiento intrauterino (M5; tabla 3).

## 7.2 Cuantificación de las Hsp

La tabla 4 muestra la cuantificación de la Hsp-27, y -60 en el suero de los neonatos sanos a término, y de los neonatos con evidencias de sepsis.

**Tabla 4** Cuantificación de las Hsp en el suero de los neonatos.

	Sanos a término (n=23)	Sepsis (n=12)	<i>p</i>
HSP (pg/mL)			
-27	0.045±0.024	0.018±0.007	=0.004
-60	13.69±5.3	23.6±3.1	≤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 sanos fue de 0.045±0.024 pg/mL la cual disminuyo significativamente 2.5-veces con respecto a los neonatos con sepsis ( $p = 0.004$ ; tabla 5).

### 7.2.2 HSP-60

La concentración de la Hsp-60 en los neonatos sanos fue de 13.69±5.3 pg/mL la cual aumento significativamente 1.7-veces con respecto a los neonatos con sepsis ( $p \leq 0.001$ ; tabla 5).

## 7.3 Cuantificación del TNF $\alpha$

La concentración del TNF $\alpha$  en los neonatos sanos fue de 2.94±0.46 pg/mL la cual aumento significativamente 3.0-veces con respecto a los neonatos con sepsis ( $p \leq 0.001$ ; tabla 5).

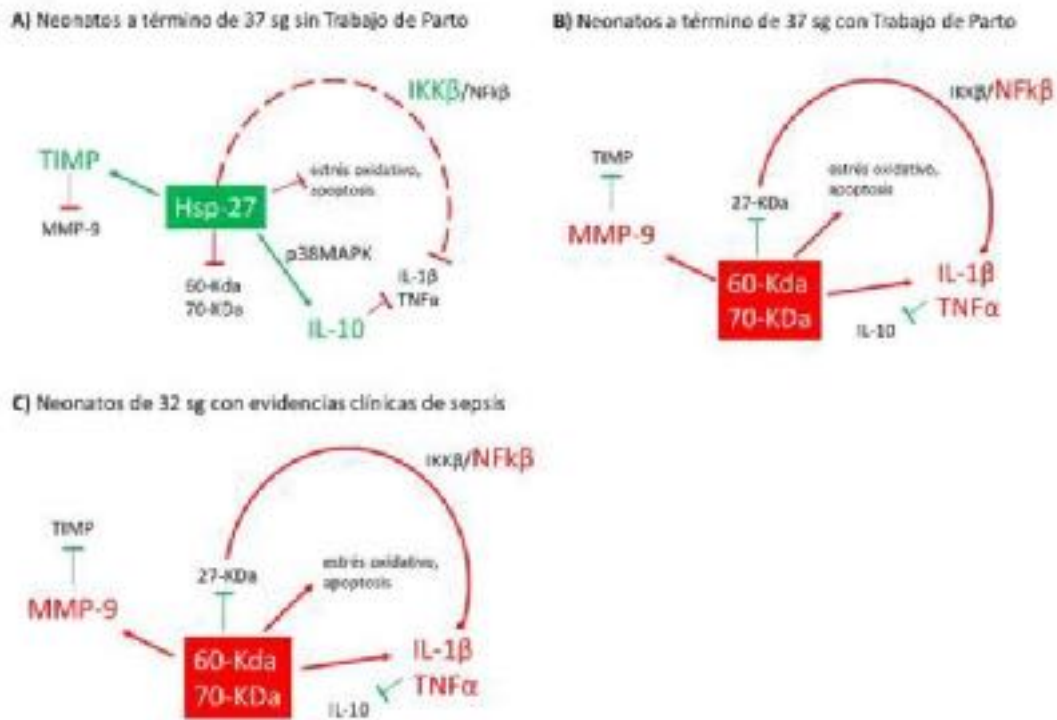
## 8.0 DISCUSIÓN

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 se conoce el perfil de secreción de las HSP en neonatos prematuros con evidencias clínicas de sepsis. Los principales resultados obtenidos en el desarrollo del presente estudio son 1) la HSP-27 disminuyó su concentración en los recién nacidos con evidencias clínicas de sepsis con respecto a los recién nacidos sanos a término (tabla 5); 2) la HSP-60 y -70 aumentaron en los recién nacidos con evidencias de sepsis con respecto a los recién nacidos sanos (tabla 5); 3) en los recién nacidos prematuros el hemocultivo fue positivo en el 33.3% del total de las muestras analizadas (4/12) y en todos los casos de recién nacidos con sepsis se obtuvo valores de las HSP (tabla 6); y 4) 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 determinado una función diferencial entre la Hsp-27 y la Hsp-60. 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 (NF $\kappa$ B) (44,65).

Nuestros resultados demuestran que la concentración de la Hsp-27 en recién nacidos sanos a término fue de  $0.045 \pm 0.024$  pg/mL la cual disminuyó en los casos de los neonatos con evidencias clínicas de sepsis temprana (tabla 5). La figura 3 indica un modelo de acción integral de las Hsp tanto en la respuesta anti y proinflamatoria. 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), de manera similar

observamos la disminución en la concentración de estas proteínas en los casos de los recién nacidos con sepsis (tabla 5).



**figura 3. Interacción de las Hsp y la respuesta inflamatoria.** (A) En el suero de los neonatos sanos a término (37 sg) 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 HSP60 y HSP70 (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.

## 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 modula de manera diferencial la expresión de las HSP como en el caso de los neonatos sanos a término con trabajo de parto activo.

## 10. REFERENCIAS

1. Goldstein B, Giroir B, Randolph A, International Consensus Conference on Pediatric S. International pediatric sepsis consensus conference: definitions for sepsis and organ dysfunction in pediatrics. *Pediatr Crit Care Med.* 2005;6(1):2-8.
2. Gonzalez BE, Mercado CK, Johnson L, Brodsky NL, Bhandari V. Early markers of late-onset sepsis in premature neonates: clinical, hematological and cytokine profile. *J Perinat Med.* 2003;31(1):60-8.
3. Sankar MJ, Agarwal R, Deorari AK, Paul VK. Sepsis in the newborn. *Indian J Pediatr.* 2008;75(3):261-6.
4. Shane AL, Sanchez PJ, Stoll BJ. Neonatal sepsis. *Lancet.* 2017;390(10104):1770-80.
5. Couto RC, Barbosa JA, Pedrosa TM, Biscione FM. C-reactive protein-guided approach may shorten length of antimicrobial treatment of culture-proven late-onset sepsis: an intervention study. *Braz J Infect Dis.* 2007;11(2):240-5.
6. Jordan JA, Durso MB. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn.* 2005;7(5):575-81.
7. Kocabas E, Sarikcioglu A, Aksaray N, Seydaoglu G, Seyhun Y, Yaman A. Role of procalcitonin, C-reactive protein, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor-alpha in the diagnosis of neonatal sepsis. *Turk J Pediatr.* 2007;49(1):7-20.
8. Mussap M, Degrandi R, Cataldi L, Fanos V, Plebani M. Biochemical markers for the early assessment of neonatal sepsis: the role of procalcitonin. *J Chemother.* 2007;19 Suppl 2:35-8.
9. Ng PC, Cheng SH, Chui KM, Fok TF, Wong MY, Wong W, et al. 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.* 1997;77(3):F221-7.
10. Vazzalwar R, Pina-Rodrigues E, Puppala BL, Angst DB, Schweig L. Procalcitonin as a screening test for late-onset sepsis in preterm very low birth weight infants. *J Perinatol.* 2005;25(6):397-402.
11. Osorio-Caballero M, Perdigon-Palacio C, Garcia-Lopez G, Flores-Herrera O, Olvera-Sanchez S, Morales-Mendez I, et al. 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*. 2015;36(3):262-9.

12. Alvarez-Cabrera MC, Barrientos-Galeana E, Barrera-Garcia A, Osorio-Caballero M, Acevedo JF, Flores-Herrera O, et al. 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*. 2018;22(11):5748-52.

13. Qazi SA, Stoll BJ. Neonatal sepsis: a major global public health challenge. *Pediatr Infect Dis J*. 2009;28(1 Suppl):S1-2.

14. Fleischmann-Struzek C, Goldfarb DM, Schlattmann P, Schlapbach LJ, Reinhart K, Kissoon N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. *Lancet Respir Med*. 2018;6(3):223-30.

15. Atreya MR, Wong HR. Precision medicine in pediatric sepsis. *Curr Opin Pediatr*. 2019;31(3):322-7.

16. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 2008;371(9606):75-84.

17. Romero R, Miranda J, Chaemsathong P, Chaiworapongsa T, Kusanovic JP, Dong Z, et al. Sterile and microbial-associated intra-amniotic inflammation in preterm prelabor rupture of membranes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2015;28(12):1394-409.

18. Denning TL, Bhatia AM, Kane AF, Patel RM, Denning PW. Pathogenesis of NEC: Role of the innate and adaptive immune response. *Semin Perinatol*. 2017;41(1):15-28.

19. Patra A, Huang H, Bauer JA, Giannone PJ. Neurological consequences of systemic inflammation in the premature neonate. *Neural Regen Res*. 2017;12(6):890-6.

20. Lawrence SM, Ruoss JL, Wynn JL. IL-17 in neonatal health and disease. *Am J Reprod Immunol*. 2018;79(5):e12800.

21. Cortese F, Scicchitano P, Gesualdo M, Filaninno A, De Giorgi E, Schettini F, et al. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *Pediatr Neonatol*. 2016;57(4):265-73.

22. Mukhopadhyay S, Puopolo KM. Risk assessment in neonatal early onset sepsis. *Semin Perinatol*. 2012;36(6):408-15.

23. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science*. 2014;345(6198):760-5.

24. Shin D, Song WO. 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*. 2015;28(14):1679-86.

25. Walczak M. [Prematurity and intrauterine hypotrophy in the light of selected medical and socioeconomic factors among children's population in Szczecin]. *Ann Acad Med Stetin*. 1991;37:65-85.

26. Gillespie SL, Anderson CM. Racial discrimination and leukocyte glucocorticoid sensitivity: Implications for birth timing. *Soc Sci Med*. 2018;216:114-23.

27. Bertagnolli M, Luu TM, Lewandowski AJ, Leeson P, Nuyt AM. Preterm Birth and Hypertension: Is There a Link? *Curr Hypertens Rep*. 2016;18(4):28.

28. Premkumar A, Henry DE, Moghadassi M, Nakagawa S, Norton ME. The interaction between maternal race/ethnicity and chronic hypertension on preterm birth. *Am J Obstet Gynecol*. 2016;215(6):787 e1- e8.

29. Lier MCI, Brosens IA, Mijatovic V, Habiba M, Benagiano G. Decidual Bleeding as a Cause of Spontaneous Hemoperitoneum in Pregnancy and Risk of Preterm Birth. *Gynecol Obstet Invest.* 2017;82(4):313-21.
30. Brown RG, Al-Memar M, Marchesi JR, Lee YS, Smith A, Chan D, et al. Establishment of vaginal microbiota composition in early pregnancy and its association with subsequent preterm prelabor rupture of the fetal membranes. *Transl Res.* 2019;207:30-43.
31. Ronzoni S, Steckle V, D'Souza R, Murphy KE, Lye S, Shynlova O. Cytokine Changes in Maternal Peripheral Blood Correlate With Time-to-Delivery in Pregnancies Complicated by Premature Prelabor Rupture of the Membranes. *Reprod Sci.* 2018:1933719118815590.
32. Nadeau-Vallee M, Obari D, Quiniou C, Lubell WD, Olson DM, Girard S, et al. A critical role of interleukin-1 in preterm labor. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2016;28:37-51.
33. Singh N, Herbert B, Sooranna GR, Orsi NM, Edey L, Dasgupta T, et al. Is myometrial inflammation a cause or a consequence of term human labour? *J Endocrinol.* 2017;235(1):69-83.
34. Bedford Russell AR, Kumar R. Early onset neonatal sepsis: diagnostic dilemmas and practical management. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2015;100(4):F350-4.
35. Chauhan N, Tiwari S, Jain U. Potential biomarkers for effective screening of neonatal sepsis infections: An overview. *Microb Pathog.* 2017;107:234-42.
36. Pammi M, Flores A, Versalovic J, Leeflang MM. Molecular assays for the diagnosis of sepsis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017;2:CD011926.
37. Wynn JL, Wong HR, Shanley TP, Bizzarro MJ, Saiman L, Polin RA. Time for a neonatal-specific consensus definition for sepsis. *Pediatr Crit Care Med.* 2014;15(6):523-8.
38. Kregel KC. Heat shock proteins: modifying factors in physiological stress responses and acquired thermotolerance. *J Appl Physiol (1985).* 2002;92(5):2177-86.
39. Garsia RJ, Hellqvist L, Booth RJ, Radford AJ, Britton WJ, Astbury L, et al. 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.* 1989;57(1):204-12.
40. Bausinger H, Lipsker D, Hanau D. Heat-shock proteins as activators of the innate immune system. *Trends Immunol.* 2002;23(7):342-3.
41. Becker J, Craig EA. Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur J Biochem.* 1994;219(1-2):11-23.
42. Stocki P, Dickinson AM. The immunosuppressive activity of heat shock protein 70. *Autoimmune Dis.* 2012;2012:617213.
43. Tsan MF, Gao B. Heat shock protein and innate immunity. *Cell Mol Immunol.* 2004;1(4):274-9.
44. Charmpilas N, Kyriakakis E, Tavernarakis N. Small heat shock proteins in ageing and age-related diseases. *Cell Stress Chaperones.* 2017;22(4):481-92.
45. De AK, Kodys KM, Yeh BS, Miller-Graziano C. 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.* 2000;165(7):3951-8.

46. Lechner P, Buck D, Sick L, Hemmer B, Multhoff G. Serum heat shock protein 70 levels as a biomarker for inflammatory processes in multiple sclerosis. *Mult Scler J Exp Transl Clin.* 2018;4(2):2055217318767192.

47. Haslbeck M, Franzmann T, Weinfurtner D, Buchner J. Some like it hot: the structure and function of small heat-shock proteins. *Nat Struct Mol Biol.* 2005;12(10):842-6.

48. van Montfort RL, Basha E, Friedrich KL, Slingsby C, Vierling E. Crystal structure and assembly of a eukaryotic small heat shock protein. *Nat Struct Biol.* 2001;8(12):1025-30.

49. Basha E, O'Neill H, Vierling E. Small heat shock proteins and alpha-crystallins: dynamic proteins with flexible functions. *Trends Biochem Sci.* 2012;37(3):106-17.

50. Velten M, Gomez-Vrielynck N, Chaffotte A, Ladjimi MM. Domain structure of the HSC70 cochaperone, HIP. *J Biol Chem.* 2002;277(1):259-66.

51. Kiang JG, Tsokos GC. Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacol Ther.* 1998;80(2):183-201.

52. Pockley AG, Henderson B, Multhoff G. Extracellular cell stress proteins as biomarkers of human disease. *Biochem Soc Trans.* 2014;42(6):1744-51.

53. Schmitt E, Gehrman M, Brunet M, Multhoff G, Garrido C. Intracellular and extracellular functions of heat shock proteins: repercussions in cancer therapy. *J Leukoc Biol.* 2007;81(1):15-27.

54. Shah M, Stanek J, Handwerker S. Differential localization of heat shock proteins 90, 70, 60 and 27 in human decidua and placenta during pregnancy. *Histochem J.* 1998;30(7):509-18.

55. MacIntyre DA, Tyson EK, Read M, Smith R, Yeo G, Kwek K, et al. Contraction in human myometrium is associated with changes in small heat shock proteins. *Endocrinology.* 2008;149(1):245-52.

56. Jordan I, Balaguer M, Esteban ME, Cambra FJ, Felipe A, Hernandez L, et al. 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.* 2016;35(1):34-40.

57. Marino LV, Pathan N, Meyer RW, Wright VJ, Habibi P. 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.* 2016;32(3):375-83.

58. Shi Y, Evans JE, Rock KL. Molecular identification of a danger signal that alerts the immune system to dying cells. *Nature.* 2003;425(6957):516-21.

59. Boldenow E, Hogan KA, Chames MC, Aronoff DM, Xi C, Loch-Caruso R. Role of cytokine signaling in group B *Streptococcus*-stimulated expression of human beta defensin-2 in human extraplacental membranes. *Am J Reprod Immunol.* 2015;73(3):263-72.

60. Varrey A, Romero R, Panaitescu B, Miller D, Chaiworapongsa T, Patwardhan M, et al. 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.* 2018;80(4):e13031.

61. Chen W, Syldath U, Bellmann K, Burkart V, Kolb H. Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system. *J Immunol.* 1999;162(6):3212-9.
62. Yang Y, Takeda A, Yoshimura T, Oshima Y, Sonoda KH, Ishibashi T. IL-10 is significantly involved in HSP70-regulation of experimental subretinal fibrosis. *PLoS One.* 2013;8(12):e80288.
63. Wang W, Weng J, Yu L, Huang Q, Jiang Y, Guo X. Role of TLR4-p38 MAPK-Hsp27 signal pathway in LPS-induced pulmonary epithelial hyperpermeability. *BMC Pulm Med.* 2018;18(1):178.
64. Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, et al. Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4. *J Biol Chem.* 2002;277(17):15028-34.
65. Wilhide ME, Tranter M, Ren X, Chen J, Sartor MA, Medvedovic M, et al. 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.* 2011;51(1):82-9.
66. Giuliano JS, Jr., Lahni PM, Wong HR, Wheeler DS. Pediatric Sepsis - Part V: Extracellular Heat Shock Proteins: Alarmins for the Host Immune System. *Open Inflamm J.* 2011;4:49-60.
67. Papadopoulos P, Pistiki A, Theodorakopoulou M, Christodouloupoulou T, Damoraki G, Goukos D, et al. Immunoparalysis: Clinical and immunological associations in SIRS and severe sepsis patients. *Cytokine.* 2017;92:83-92.
68. Qu B, Jia Y, Liu Y, Wang H, Ren G, Wang H. The detection and role of heat shock protein 70 in various nondisease conditions and disease conditions: a literature review. *Cell Stress Chaperones.* 2015;20(6):885-92.
69. Wheeler DS, Fisher LE, Jr., Catravas JD, Jacobs BR, Carcillo JA, Wong HR. Extracellular hsp70 levels in children with septic shock. *Pediatr Crit Care Med.* 2005;6(3):308-11.
70. He Y, Du WX, Jiang HY, Ai Q, Feng J, Liu Z, et al. Multiplex Cytokine Profiling Identifies Interleukin-27 as a Novel Biomarker For Neonatal Early Onset Sepsis. *Shock.* 2017;47(2):140-7.
71. Alder MN, Lindsell CJ, Wong HR. The pediatric sepsis biomarker risk model: potential implications for sepsis therapy and biology. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2014;12(7):809-16.

## 11.0 PRODUCTOS DERIVADOS DEL PRESENTE ESTUDIO



**Federación Nacional de Neonatología de México A.C.**  
Otorga la Presente  
**CONSTANCIA**

**ARTURO ALEJANDRO CANUL EUAN**

CIHIRAN ZUÑIGA GONZALEZ, JUAN H Y ESTHER ANIA PALACIOS LUNA, ROMANEO FLORES MAIDA CIJANOS,  
LEONOR PATRICIA SALTIGERAL TIGERAL, PERLA KARINA GARCIA MAY, HECTOR FLORES HERRERA

Por el Póster

**SECRECIÓN DIFERENCIAL DE LAS PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO EN RECIÉN NACIDOS  
SANOS A TÉRMINO Y PREMATUROS CON EVIDENCIA DE SEPSIS**



Dra. Fionngela Ochoa Escobedo  
Presidenta de la Asociación de  
Neonatólogos de México, A.C.



Dr. Raúl Villegas Silva  
Presidente FNNM 2017-2019



Vtra. Adela Elena Arreola  
Coordinadora IX Congreso de  
Enfermería Neonatal

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 gels desnaturalizantes**

ACEPTADO

Registro: 21254-3213101

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 Cárbalo Vázquez.- Director de Investigación  
C.P. Gabriel Vázquez Sierra.- Jefe del Departamento de Contabilidad  
y Responsable de la Unidad Costable de Proyectos, INPer

AGM/phg

## ANEXO 2

### Consentimiento informado



INSTITUTO  
NACIONAL DE  
PERINATOLOGÍA  
Instituto Español de las Reinas

#### 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 ELECTROFESIS 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 bebé 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 bebé para la toma de una muestra de sangre, la cual será realizado por el personal médico responsable y no representa ningún riesgo para su bebé.
2. La muestra será analizada en el departamento de 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 bebé.
3. La detección de las bacterias causantes de la infección permitirá proporcionarle una mejor atención terapéutica a su bebé.

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 invitarle 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 bebé en el estudio.

La información que se obtenga del estudio será estrictamente confidencial y será usado 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 (sa) 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		
REPRESANTANTE		
INVESTIGADOR		
TESTIGO		
TESTIGO		