

BMJ Open

BMJ Open is committed to open peer review. As part of this commitment we make the peer review history of every article we publish publicly available.

When an article is published we post the peer reviewers' comments and the authors' responses online. We also post the versions of the paper that were used during peer review. These are the versions that the peer review comments apply to.

The versions of the paper that follow are the versions that were submitted during the peer review process. They are not the versions of record or the final published versions. They should not be cited or distributed as the published version of this manuscript.

BMJ Open is an open access journal and the full, final, typeset and author-corrected version of record of the manuscript is available on our site with no access controls, subscription charges or pay-per-view fees (<http://bmjopen.bmj.com>).

If you have any questions on BMJ Open's open peer review process please email
editorial.bmjopen@bmj.com

BMJ Open

BNP reference interval of newborns from healthy and preeclamptic women

Journal:	<i>BMJ Open</i>
Manuscript ID	bmjopen-2018-022562
Article Type:	Research
Date Submitted by the Author:	22-Feb-2018
Complete List of Authors:	Rodriguez, David; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Clinical Research; Instituto de Cardiologia y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Garcia-Rivas, Gerardo; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Laresgoiti-Servitje, Estibalitz; Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Ciencias Clinicas Yañez, Jesus; Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Torre-Amione, Guillermo; Instituto de Cardiologia y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Jerjes-Sanchez, Carlos; Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Clinical Research
Keywords:	Biomarkers, BNP, reference interval, newborn, preeclampsia

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **BNP reference interval of newborns from healthy and preeclamptic women**
4
5
6

7 David Rodriguez^{a,b}, Gerardo Garcia-Rivas^a, Estibalitz Laresgoiti-Servitje^c, Jesus Yañez^b, Guillermo
8 Torre-Amione^{a, b, d}, Carlos Jerjes-Sanchez^{a,b*}.
9
10
11

12 ^a*Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de
13 Medicina, Tecnologico de Monterrey, Mexico.*
14
15

16 ^b*Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la
17 Salud, Tecnologico de Monterrey, Mexico.*
18
19

20 ^c*Ciencias Médicas Clínicas, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de
21 Monterrey, Mexico.*
22
23

24 ^d*Methodist DeBakey Heart and Vascular Center, The Methodist Hospital, USA.*
25
26
27

28 **ORCID ID:**
29

- 30 • David Rodriguez: <https://orcid.org/0000-0002-0811-4235>
31 • Gerardo Garcia-Rivas: <https://orcid.org/0000-0003-4731-3293>
32 • Estibalitz Laresgoiti-Servitje: <https://orcid.org/0000-0002-3271-9955>
33 • Carlos Jerjes-Sanchez: <https://orcid.org/0000-0003-3222-7405>
34
35

36 ***Corresponding author:** Carlos Jerjes-Sanchez, Director of Clinical Research, Instituto de
37 Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud. Centro Medico Zambrano Hellion. Batallón San Patricio
38 112, Real de San Agustin, 66278 San Pedro Garza García, Nuevo Leon. México. Email:
39 jerjes@prodigy.net.mx, carlos.jerjes@udicem.org Telephone: +5281-88880000.
40
41
42

43 **Keywords:** Biomarkers; BNP; reference interval; newborn; preeclampsia
44

45 **Word count:** 3426.
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Objective: To define and compare the reference interval of BNP in healthy newborns from healthy mothers and with severe preeclampsia.

Design: Prospective, multicenter, cross-sectional study.

Setting: Four obstetric wards of second-level academic hospitals.

Participants: 167 healthy newborns, from 146 healthy and 21 severe preeclamptic women. We included newborns from healthy mothers with full-term pregnancies (38 to 42 gestational weeks), who received adequate prenatal care, and who had Apgar scores ≥ 7 at 0 and 5 minutes. Newborns with chromosomopathies identified during prenatal consultations, those with respiratory distress, and those with cardiac or pulmonary disease detected in the first pediatric evaluation were excluded from this study. In the group of preeclamptic women, we considered the same inclusion criteria, but the patients also had to meet the diagnostic criteria for preeclampsia with severity features, according to the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) guidelines. The same exclusion criteria used for the healthy group was applied to the preeclampsia-associated newborn.

Interventions: A single blood sample from the umbilical cord artery after delivery (vaginal or caesarean section).

Primary outcome: Reference level of BNP in healthy newborns.

Results: In the healthy newborns group, the median BNP was 12.15 pg/mL (IQR 7.7 – 16.8 pg/mL) and in the preeclamptic group 20.8 pg/mL (IQR 5.8 – 46.5 pg/mL). The reference interval for BNP in healthy newborns was 5 - 34 pg/mL (95%CI 5 -38.8 pg/mL). We identified higher expression of BNP in newborns from preeclamptic women overall ($p=0.037$) and in newborns exposed to stress conditions, such as complications during labour and delivery ($p=0.038$).

Conclusions: In healthy newborns, plasma BNP concentrations at birth were lower than reported in other similar populations. In neonates with stress conditions, the higher expression of this biomarker establishes another possible link between stress and the cardiovascular response.

Trial registration: ClinicalTrials.gov: NCT02574806.

Article summary

Strengths and limitations of this study

- First prospective multicenter cohort study aimed to determine the reference interval of BNP in the healthy newborn after delivery.
- Study population, sample size, and statistical analysis were defined according to the guidelines from the Clinical & Laboratory Standards Institute.
- There were no serial measurements of BNP for follow-up.
- The study is limited only to BNP, due to its relevance as a marker of ventricular dysfunction.
- No imaging tools were used for structural and functional assessment.

Original protocol available at Supplementary material.

Funding statement: This study was supported by Endowed Chair in Cardiology (Tecnológico de Monterrey, 0020CAT131); CONACYT (Grant 151136, 133591, 269399) and Xignus Research Fund.

Disclosure of interest: None declared.

Authors contribution: D.R. contributed to the design and implementation of the protocol, the analysis of the results, and the writing of the manuscript. G.GR contributed to the analysis of the results and the writing of the manuscript. E.LS. contributed to the analysis of the results and the writing of the manuscript. J.Y. contributed to the design of the protocol, the analysis of the results, and the writing of the manuscript. G.TA. contributed to the design of the protocol, the analysis of the results, and writing the manuscript. C.JS contributed to the design and implementation of the protocol, the analysis of the results and the writing of the manuscript.

Introduction

Several studies have proved the B-type-natriuretic peptide (BNP) as a promising diagnostic and stratification biomarker in multiple clinical settings concerning the adult population [1]. In pediatric patients with cardiac disorders, BNP is an essential tool for diagnosis, risk stratification, and prognosis [2]. However, newborns have peak levels in the first days of life, which decrease within the first week and vary greatly [3]. The published normal range of BNP and the amino-terminal segment of its prohormone (NT-pro-BNP) appear to have an age- and gender-dependent trend [4]. The ample range of plasma concentrations of both biomarkers can be attributed to several perinatal factors that may be influencing myocardial performance during the postnatal transition period [3,5–8]. This evidence suggests that BNP, perhaps, is not the best option as a biomarker in neonates [4]. On the other hand, in newborns with acute respiratory distress, a normal plasma BNP value may have a high negative predictive value for ruling out ventricular dysfunction from other acute disorders (i.e., respiratory distress, sepsis, or metabolic alterations), improving the quality of medical care. Additionally, preeclampsia is a vascular disorder that increases maternal and fetal/neonatal morbidity and mortality [9], increases BNP expression [10] and has deleterious effects on the cardiovascular system of the newborn [11]. Whether these maternal mechanisms influence the expression of BNP in the newborn is an unmet question. Currently, plasma BNP concentration has an impact in early disease stratification. Nonetheless, its role and the normal concentrations in the healthy neonatal population has not been elucidated. Also, the influence of maternal preeclampsia on the cardiovascular system of the newborn is not well known. Therefore, we conducted the first multicenter, prospective, cross-sectional study to establish the reference interval of BNP in healthy newborns (HN) and compared it with those from women with severe preeclampsia.

Methods

A multicenter, prospective, cross-sectional study was designed to establish the reference interval of plasma BNP in HN at birth and to compare it with those in offspring of preeclamptic mothers. The study was conducted at the obstetrics wards of four academic-hospitals, during the period from April

1
2
3 2014 to April 2015. Medical health records were reviewed to assess the potential eligibility of each
4 participant, and a direct interview confirmed that all inclusion criteria were met. We included
5 newborns from healthy mothers with full-term pregnancies (38 to 42 gestational weeks), who
6 received adequate prenatal care, and who had Apgar scores ≥ 7 at 0 and 5 minutes. Newborns with
7 chromosomopathies identified during prenatal consultations, those with respiratory distress, and
8 those with cardiac or pulmonary disease detected in the first pediatric evaluation were excluded
9 from this study. In the group of preeclamptic women, we considered the same inclusion criteria, but
10 the patients also had to meet the diagnostic criteria for preeclampsia with severity features,
11 according to the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) guidelines. The
12 same exclusion criteria used for the HN group was applied to the preeclampsia-associated newborn
13 (PAN) group (Figure 1).
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 We collected a single blood sample from the umbilical cord artery after delivery (vaginal or
27 caesarean section). Arterial blood was preferred over venous blood because this would allow a
28 direct measurement of plasma BNP concentration from the bloodstream of the newborn. After
29 determining the BNP reference interval in HN, this group was compared with newborns from
30 mothers with severe preeclampsia. Anthropometry and clinical status were obtained from the
31 records of attending pediatricians and neonatologists. All infants were evaluated in the nursery ward
32 during the first hours of the neonatal period to ascertain their health status. Written informed
33 consent was obtained from all mothers before newborns enrollment. This study was conducted
34 according to the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Research Committees of
35 the Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey. The trial was registered
36 in ClinicalTrials.gov: NCT02574806.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 ***BNP measurement***

50

51 BNP was measured by using the Triage® MeterPlus and Triage® BNP Test (Alere™). The Triage
52 BNP assay is a rapid, point of care fluorescence immunoassay for the quantitative measurement of
53 BNP in potassium ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) anticoagulated whole blood or plasma
54
55
56
57
58
59
60

specimens [12]. In brief, the sample reacts with fluorescent antibody conjugates and flows through the test device by capillary action. Complexes of fluorescent antibody conjugate are captured in a specific area for BNP. Plasma BNP concentration in the specimen is directly proportional to the fluorescence detected, and in approximately 15 minutes, a result is obtained. The measurement range of the BNP assay is 5 pg/mL to 5000 pg/mL. A measurement range > 100 pg/mL is determined as abnormal by the equipment referencing literature [12].

16 *Study Definitions*

A healthy mother was considered as a biological female between 15 and 36 years old, without chronic disease history or pregnancy-associated diseases. Adequate prenatal care was defined using the World Health Organization criterion, consisting of at least five obstetric office visits. Severe preeclampsia was diagnosed according to the American College of Obstetricians and Gynecologists criteria which consists of: the presence of preeclampsia with systemic involvement, including heart failure, visual or cerebral disturbances, thrombocytopenia, abnormal liver tests and/or renal failure [13]. Complicated delivery was defined as prolonged labor (≥ 14 hours), evidence of abnormal antenatal cardiotocographic records, no reassuring fetal status, amniotic fluid abnormalities (i.e., volume disturbances, meconium), aspiration of meconium during birth or umbilical cord compression.

39 *Statistical analysis*

The sample size was determined based on the guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute, which establishes that the minimum sample of healthy reference subjects required to obtain a reference interval with a 95% CI is 146 subjects [14–16]. Continuous variables were expressed as mean \pm standard deviation. Furthermore, categorical variables were expressed as numbers and percentages. All values are rounded to the nearest tenth decimal. Values of BNP were shown as median and interquartile range (IQR). The reference interval of BNP in HN was determined by estimation of the 2.5th and 97.5th percentile with 95% confidence interval (95%CI), by parametric or non-parametric methods depending on BNP values distribution, as recommended

1
2
3 by Clinical and Laboratory Standards Institute (15). Non-parametric Mann-Whitney U tests were
4 performed to evaluate BNP differences between groups. Multiple linear regression models
5 assessed if maternal age, gestational age at delivery by Dubowitz score, or newborn weight could
6 be associated with BNP concentrations in HN and PAN groups, separately. Chi-square tests for
7 association were conducted to evaluate percentage differences between categorical variables
8 among newborns from HN and PAN groups. A probability of alpha-error < 0.05 was considered for
9 significant results. Statistical analysis was performed using the Statistics Package for the Social
10 Sciences (SPSS) from IBM Corporation, version 22, and Stata/IC 14.2 for Mac (College Station,
11 TX). Graphs were made with Prism 7 for Mac OS X.
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

Patient involvement

23 None patient was involved.
24
25
26
27

Results

28 From April 2014 to April 2015, 167 samples were collected in two hospitals from the public sector
29 and two from the private sector; 146 newborns were categorized as the healthy group, and 21 as
30 the preeclampsia group. The latter group was composed by newborns from mothers who developed
31 preeclampsia during the third trimester of pregnancy, requiring admission to the obstetric intensive
32 care unit. Median maternal age was 23.5 (18 - 29) years old. Using Naegele's rule, all mothers of
33 HN delivered at term 39.5 (38.5 – 40.2) weeks. Furthermore, 76 participants (52%) experienced
34 spontaneous labor and 87 participants (59.6%) presented spontaneous rupture of membranes.
35 Both the HN and PAN groups had similar proportions of nulliparous and multiparous mothers and
36 small percentages of previous miscarriages or abortions. Most mothers in both groups were under
37 epidural analgesia during delivery, and a high rate of newborn deliveries in HN and PAN groups
38 were performed by caesarean section (45.9% and 85.7%, respectively). We observed delivery
39 complications in 23 (15.8%) and 7 (33.3%) neonates from the HN and PAN group, respectively.
40 From the PAN group, five (24%) neonates presented cyanosis and three (14.2%) respiratory
41 complications. There were no differences in the rate of complications between the HN and PAN
42 groups ($\chi^2 = 0.000$, $p = 0.999$).
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

distress. Table 1 shows the demographic and clinical characteristics of mothers and newborns, in the HN and the PAN groups. There was no missing data.

A non-normal distribution of BNP values was found both study groups by visual histogram inspection and the Shapiro-Wilk test ($p<0.05$) (Figure 2A and 2B). Therefore, we decided to follow a non-parametric analysis approach to determine the reference interval and assess group differences in BNP concentrations. In the healthy group, the BNP median was 12.15 pg/mL (IQR 7.7 – 16.8 pg/mL) and in the preeclamptic group 20.8 pg/mL (IQR 5.8 – 46.4 pg/mL). The reference interval of BNP in healthy newborns based on 2.5th and 97.5th percentiles was 5 - 34 pg/mL (95% CI 5 - 38.8 pg/mL) (Figure 3A). A Mann Whitney U test assessed differences in BNP concentrations among the HN and PAN groups. Offspring from the PAN group had significantly higher BNP levels compared to those in the HN ($z=2.08$, $p = 0.037$). Children in the PAN group had a mean rank of 104.57, a median of 20.8 (IQR 5.8-46.4 pg/mL), whereas those in the healthy newborn group had a mean rank of 81.04, and a median of 12.5 (IQR 7.7-16.8 pg/mL). Nonetheless, this difference was not clinically relevant since BNP concentrations were not associated with negative outcomes (i.e., death or congenital cardiac disease) in the participants. Figure 3B shows plasma BNP concentrations in HN and PAN groups. Additionally, BNP concentrations between the HN and PAN groups according to several maternal and newborn variables were compared by conducting Mann-Whitney U tests. Children from the HN group delivered by C-section had significantly higher ($z=2.36$, $p=0.018$) BNP values than those born by vaginal delivery (median 13.8 pg/ml, IQR 8.9-18.1 pg/mL vs 11.2 pg/mL, IQR 6.8-15.3 pg/mL, respectively). The Mann Whitney U test that evaluated BNP concentrations between newborns in the PAN group with and without delivery complications was also significant, and in the expected direction ($z=2.09$, $p=0.038$). Those babies with delivery complications had higher BNP values [mean rank=15, median=47.9 (IQR=12.2-62.6 pg/mL)] compared to the ones with non-complicated deliveries [mean rank=9, median=15.5 (IQR=5.0-25.4 pg/mL)]. Medians, interquartile range (IQR) and significant differences are shown in Table 2.

1
2
3 Multiple linear regression models were performed to evaluate if maternal age, gestational age at
4 delivery by Dubowitz score, or newborn's weight could predict BNP concentrations in HN group and
5 the PAN group, separately. These models were not significant ($p=0.24$ in HN group and $p=0.38$ in
6 PAN group), and none of the variables was significantly associated with newborn BNP
7 concentrations in any of the groups. Lastly, chi-square tests for association were conducted to
8 evaluate percentage differences in labor initiation, a method of membrane rupture, the use of
9 analgesia during delivery, development of delivery complications, the presence of cyanosis or
10 respiratory distress, and admission to the neonatal intensive care unit among newborns from HN
11 and PAN groups. Analyses showed no significant association with spontaneous or induced labor
12 initiation ($p = 0.209$), the method of membrane rupture ($p = 0.059$), use of analgesia during labor (p
13 = 0.75), nor for the presence of delivery complications ($p = 0.109$) with HN or PAN groups.
14 However, significant association was found between newborns born from preeclamptic mothers and
15 the presence of cyanosis ($\chi^2(1)=3583$, $p=0.000$, Cramer's $V=0.46$); the development of respiratory
16 distress ($\chi^2(1)=21.23$, $p=0.000$, Cramer's $V=0.35$); and admission to neonatal intensive care unit ($\chi^2(1)=21.23$,
17 $p=0.000$, Cramer's $V=0.35$).
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

Discussion

34 The results from this multicenter study provide three important observations regarding the use of
35 plasma BNP concentrations in the pediatric population. Firstly, plasma BNP concentrations were
36 lower in healthy offspring population at birth, compared to those observed in similar populations and
37 lower than the values detected in pediatric [5,17] and adult patients [10]. Secondly, higher plasma
38 BNP concentrations in newborns with two stressors (i.e., preeclampsia and complicated delivery)
39 confirms another link between stress and cardiac response [18]. Lastly, high peak levels of plasma
40 BNP concentrations known to be present at birth, as a consequence of the physiological conditions
41 of the newborn, were not observed in our HN group.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 The release of BNP results in improved myocardial relaxation and is targeted at protecting the
54 cardiovascular system from the effects of volume overload. The initiation of synthesis of pro-BNP
55
56
57
58
59
60

1
2
3 results from cardiac wall stress caused by volume expansion or pressure overload. Consequently,
4 the peptide is cleaved to produce the biologically active hormone BNP and the inactive NT-pro-
5 BNP, being both detectable and measured in the circulation [17]. In general, these peptide levels
6 are reasonably correlated, and either of them can be used in patient care; although the absolute
7 levels are not interchangeable [17]. Although the usefulness of BNP concentrations in identifying
8 different ventricular dysfunction stages or mortality risks in the adult [19] and pediatric populations
9 [5,17,20] has been well established, studies in children are more challenging and remain limited
10 than those in adults. One of the most important factors promoting this limitation is the lack of
11 normative biomarker values in children [17]. Additionally, average adult BNP values vary depending
12 on the assay method and patient demographics; whereas appropriate reference values are lacking
13 in children.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

26 Our results show that in HN at birth, plasma BNP concentration was lower [median 12.15 pg/mL
27 (IQR 7.7 – 16.8 pg/mL)] than that reported in other neonate populations (96 pg/mL (mean 134 ± 130
28 pg/mL) without disease [5]. Although, in this study, newborns included had signs and symptoms of
29 a cardiovascular disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a
30 cardiovascular illness with or without anatomic defect [5]. Most studies show high levels of BNP and
31 NT-pro-BNP immediately after birth, decreasing during the third or fourth day of life [21,22]. Other
32 reports indicate a tendency or significant decrease in plasma BNP concentrations, suggesting that
33 the peptide levels are dependent on age, the assay used for its measurement, and possibly the
34 gender [8]. Additionally, a BNP cut-off value of 170 pg/mL during the first 7 days of extrauterine life
35 and value of 41 pg/mL for those older than 7 days but younger than 19-years-old has been
36 established [5].
37
38
39

40 In our results, BNP expression was independent of maternal characteristics including age, and
41 obstetric history. However, we did find increased BNP values in babies delivered by C-section, but
42 only in the HN group. This finding is in accordance with previous studies that have reported that
43 BNP expression was dependent on delivery method [21–23]. Regarding the newborn, neither
44
45
46
47
48

1
2
3 gender, weight, APGAR score at 5 minutes, nor gestational age had a statistically significant impact
4 on the expression of BNP values.
5
6
7
8

9 Even though the reason for higher NT-pro-BNP or BNP values soon after birth remains unknown,
10 several mechanisms have been considered: a) the role of natriuretic peptides in the homeostasis of
11 the fetal-neonatal-mature transitional circulation, b) increased body water, c) rise in the systemic
12 pre-load and afterload to the pulmonary arterial circulation and, d) the stiffness of neonatal
13 myocardium [5]. Moreover, newborns may be less responsive to natriuretic peptides, so a higher
14 secreted level may be required to promote the well-recognized natriuresis that commences within
15 the first week of life. During this time, the precipitous decrease in pulmonary vascular resistance
16 may also be promoted by natriuretic peptides [5]. On the other hand, our results suggest that
17 perinatal factors related to postnatal transition do not have any influence on myocardial
18 performance. Since it has been demonstrated, both in experimental and clinical contexts [24–26],
19 that BNP does not cross the placental barrier, these values only reflect the myocardial performance
20 of the newborn.
21
22
23

24 The plasma BNP concentrations (median 12.15 pg/mL, IQR 7.7 – 16.8 pg/mL) observed in our HN
25 population were similar to BNP levels throughout pregnancy in healthy women [10]. This
26 observation suggests that a plasma BNP concentration > 20 pg/mL in pregnant women may
27 indicate ventricular stress and/or subclinical cardiac dysfunction, and a similar consideration could
28 be applied to the newborn population. Currently, in adult patients attended at the Emergency
29 Department, ventricular dysfunction is unlikely when plasma BNP concentrations are < 100 pg/mL.
30 However, some studies have suggested that a cut-off value of 50 pg/mL, rather than 100 pg/mL, will
31 increase its sensitivity and negative predictive value in adult or pediatric populations [27]. The
32 clinical implications of our findings suggest that in newborns a reference interval of 5 - 34 pg/mL
33 (95% CI 5 - 38.8 pg/mL) instead of < 100 pg/mL could increase its sensitivity and the negative
34 predictive value reducing the proportion of false positives. It is possible that the lower plasma BNP
35 concentrations observed in our study, as suggested by other observations [5,8,28–30], may depend
36 on the timing of sampling, as the BNP levels are known to fluctuate over time.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

on racial or genetic characteristics. Recently, results from a German study support this consideration based on higher plasma BNP concentrations (32.02 ± 3.37 pg/mL, mean \pm SE) compared to our HN population [31]. However, the mechanisms behind this finding remain as an unresolved question.

Another relevant result was a higher plasma BNP concentrations in neonates under two stressors (maternal preeclampsia and delivery complications), compared to HN (median 37.1, IQR 36.2 – 39.2 pg/mL, vs 12.15, IQR 7.7 – 16.8 pg/mL, $p=0.038$) despite a good adaptation to extrauterine life. Although the stress role in cardiovascular disorders has been well established [18], its participation in other pediatric clinical models [19] is still uncertain. Since there is an embryologic link between neurologic diseases and cardiomyopathy (common neuroectodermal origin), catecholaminergic overexpression (noradrenaline) in neuroendocrine disease may elicit an abnormal response in the myocardial adrenergic receptors. Thus, in early stages, if this overexpression is not sustained, cellular disarray could induce higher BNP concentrations. In late stages, and under conditions of continued stress, this mechanism could be linked to several models of transient hypertrophic cardiomyopathy [19]. However, in this group, plasma BNP concentrations did not have any clinical relevance; the results suggest that another link may be participating among the stress and the cardiovascular responses, as it has been observed in different cardiovascular clinical models [18].

Lastly, although despite previous evidence establishing different plasma BNP concentrations depending on the type of delivery [21–23] and by the presence of preeclampsia [2], our results did not reproduce these observations. Our study group only showed increased BNP concentrations in neonates who were born by C-section from healthy mothers. Also, no differences among delivery type and plasma BNP concentrations were identified.

There are several potential limitations of our study. A major limitation was the lack of long-term follow-up of the offspring, with pediatric visits and blood draws to establish serial measurements of

1
2
3 BNP which could help determine its prognostic value of BNP for cardiovascular conditions during
4 different stages of growth and development along with its relevance for chronic diseases. However,
5 our aim was only to focus on the assessment of BNP expression in the HN as a tool for clinical
6 assessment in the compromised neonate. Additionally, maternal plasma BNP concentrations were
7 not obtained, nor other biomarkers or imaging diagnostic tools were used. The influence of the
8 placenta on biomarker levels was not examined by this study, and the sample size of the newborns
9 from mothers with preeclampsia is small compared to the HN group (21 vs 146). Anyhow, according
10 to the Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines, it is reasonable to collect 20 samples of
11 well-selected subjects to verify the reference interval of a specific population [15].
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

Clinical implications

24 Newborns at birth with respiratory distress present an extra challenge to most physicians because
25 of a lack of a well-communicated history. Rapid evaluation is needed so that they can be referred
26 quickly to the correct physician (i.e., cardiologist or pulmonologist) to receive appropriate treatment.
27 This presented scenario is serious, due to its severity and because clinical assessments often fail to
28 stratify these patients adequately. In this regard, if our results are reproduced, plasma BNP
29 concentrations could have a great future as a bedside, non-invasive, non-expensive, and non-
30 operator dependent indicator for neonatal care. We strongly recommend replicating our findings in
31 different healthy populations to increase the understanding of BNP and its clinical implication in
32 cardiovascular medicine. In our population, the upper limit of BNP expression in the HN is < 40
33 pg/mL. If this result is reproduced in future studies, this value could be used to address the clinical
34 suspicion about the etiology of the neonate with respiratory difficulty while shortening the time to
35 diagnosis and undergo specialized treatment. BNP is a reliable biomarker for physiological and
36 pathological processes which improve the accuracy and precision of clinical approaches suggesting
37 improvement in cardiovascular care. Subclinical expression of heart disease now can be addressed
38 based on the reference interval of BNP in HN.
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

Conclusion

In healthy newborns, BNP concentration at birth was lower than previously reported in similar populations. Neonates under stress conditions related to complications at birth showed a higher expression of this biomarker, which elucidates a possible link between stress and the corresponding cardiovascular response in this population.

Acknowledgments: Thanks to *Werfen IL, Mexico* for providing equipment and supplies, as well as to the team of doctors and fellows of Gynaecology and Obstetrics and Paediatrics of Programas Multicéntricos de Residencias Médicas, Tecnológico de Monterrey. Special thanks to Dr Flores-Tamez, for his support and giving us access to the facilities for the development of the study. To Dr Kristopher J. Currie G for editorial assistance.

References

- 1 Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007;50:2357–68.
2 doi:10.1016/j.jacc.2007.09.021
- 3 Vijlbrief D. *Cardiac biomarkers in Neonatology*. Utrecht University 2015.
- 4 Koch A, Singer H. Normal values of B type natriuretic peptide in infants, children, and
adolescents. *Heart Br Card Soc* 2003;89:875–8.
- 5 Ten Kate CA, Tibboel D, Kraemer US. B-type natriuretic peptide as a parameter for pulmonary
hypertension in children. A systematic review. *Eur J Pediatr* 2015;174:1267–75.
doi:10.1007/s00431-015-2619-0
- 6 Law YM, Hoyer AW, Reller MD, et al. Accuracy of plasma B-type natriuretic peptide to
diagnose significant cardiovascular disease in children: the Better Not Pout Children! Study. *J
Am Coll Cardiol* 2009;54:1467–75. doi:10.1016/j.jacc.2009.06.020
- 7 Smith J, Goetze JP, Andersen CB, et al. Practical application of natriuretic peptides in
paediatric cardiology. *Cardiol Young* 2010;20:353–63. doi:10.1017/S1047951110000211
- 8 Koch A, Zink S, Singer H. B-type natriuretic peptide in paediatric patients with congenital heart
disease. *Eur Heart J* 2006;27:861–6. doi:10.1093/euroheartj/ehi773
- 9 Nir A, Lindinger A, Rauh M, et al. NT-pro-B-type natriuretic peptide in infants and children:
reference values based on combined data from four studies. *Pediatr Cardiol* 2009;30:3–8.
doi:10.1007/s00246-008-9258-4
- 10 Backes CH, Markham K, Moorehead P, et al. Maternal Preeclampsia and Neonatal Outcomes.
J Pregnancy 2011;2011:1–7. doi:10.1155/2011/214365
- 11 Resnik JL, Hong C, Resnik R, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide (BNP) levels in
normal and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* 2005;193:450–4.
doi:10.1016/j.ajog.2004.12.006
- 12 Hakim J, Senterman MK, Hakim AM. Preeclampsia Is a Biomarker for Vascular Disease in Both
Mother and Child: The Need for a Medical Alert System. *Int J Pediatr* 2013;2013:1–8.
doi:10.1155/2013/953150
- 13 Inverness Medical. Triage BNP product insert. 2009. <http://www.alere.com/en/home/product-details/triage-bnp-test.html>
- 14 Chaiworapongsa T, Chaemsathong P, Yeo L, et al. Pre-eclampsia part 1: current
understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* 2014;10:466–80.
doi:10.1038/nrneph.2014.102
- 15 Determining Laboratory Reference Intervals: CLSI Guideline Makes the Task Manageable. *Lab
Med* 2009;40:75–6. doi:10.1309/LMEHV3HP39QOFJPA
- 16 Horowitz GL, Clinical and Laboratory Standards Institute. *Defining, establishing, and verifying
reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*. 2010.
- 17 Katayev A, Balciza C, Seccombe DW. Establishing reference intervals for clinical laboratory
test results: is there a better way? *Am J Clin Pathol* 2010;133:180–6.
doi:10.1309/AJCPN5BMTSF1CDYP

- 1
2
3 17 Bernus A, Wagner BD, Accurso F, et al. Brain Natriuretic Peptide Levels in Managing Pediatric
4 Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 2009;135:745–51. doi:10.1378/chest.08-
5 0187
- 6
7 18 Black PH, Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*
8 2002;52:1–23.
- 9
10 19 Jerjes-Sanchez C, Garcia N, Leon-Gonzalez ED de, et al. Significance of Biomarker Panel
11 Including Cardiac Troponin I, D-dimer, and B-Type Natriuretic Peptide in Acute Aortic
12 Dissection. *J Cardiol Ther* Published Online First: 2013. doi:10.12970/2311-052X.2013.01.02.4
- 13
14 20 Yañez J, Rodriguez D, Treviño C, et al. Stress transient hypertrophic cardiomyopathy and B-
15 type natriuretic peptide role. *Pediatr Cardiol* 2013;34:702–6. doi:10.1007/s00246-012-0317-5
- 16
17 21 Gemelli M, Mamì C, Manganaro R, et al. Effects of the mode of delivery on ANP and renin-
18 aldosterone system in the fetus and the neonate. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*
19 1992;43:181–4.
- 20
21 22 Seong WJ, Yoon DH, Chong GO, et al. Umbilical cord blood amino-terminal pro-brain
22 natriuretic peptide levels according to the mode of delivery. *Arch Gynecol Obstet*
23 2010;281:907–12. doi:10.1007/s00404-009-1253-3
- 24
25 23 Fortunato G, Carandente Giarrusso P, Martinelli P, et al. Cardiac troponin T and amino-terminal
26 pro-natriuretic peptide concentrations in fetuses in the second trimester and in healthy
27 neonates. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:834–6. doi:10.1515/CCLM.2006.144
- 28
29 24 Mulay S, Varma DR. Placental barrier to atrial natriuretic peptide in rats. *Can J Physiol
30 Pharmacol* 1989;67:1–4.
- 31
32 25 Bakker J. Reference Values for N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Umbilical Cord
33 Blood. *Clin Chem* 2004;50:2465–2465. doi:10.1373/clinchem.2004.040253
- 34
35 26 Zhu R, Nie Z. A Clinical Study of the N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide in Myocardial
36 Injury after Neonatal Asphyxia. *Pediatr Neonatol* 2016;57:133–9.
37 doi:10.1016/j.pedneo.2015.08.001
- 38
39 27 Omar HR. Acute cardiogenic pulmonary edema with normal BNP: the value of repeat BNP
40 testing. *Am J Emerg Med* 2015;33:605.e5–605.e6. doi:10.1016/j.ajem.2014.10.006
- 41
42 28 El-Khuffash A, Molloy EJ. Are B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal-pro-BNP useful
43 in neonates? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007;92:F320–4. doi:10.1136/adc.2006.106039
- 44
45 29 Mir TS, Laux R, Hellwege HH, et al. Plasma concentrations of aminoterminal pro atrial
46 natriuretic peptide and aminoterminal pro brain natriuretic peptide in healthy neonates: marked
47 and rapid increase after birth. *Pediatrics* 2003;112:896–9.
- 48
49 30 Mannarino S, Garofoli F, Mongini E, et al. BNP concentrations and cardiovascular adaptation in
50 preterm and fullterm newborn infants. *Early Hum Dev* 2010;86:295–8.
51 doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.04.003
- 52
53 31 Blohm ME, Arndt F, Sandig J, et al. Cardiovascular biomarkers in paired maternal and umbilical
54 cord blood samples at term and near term delivery. *Early Hum Dev* 2016;94:7–12.
55 doi:10.1016/j.earlhumdev.2016.01.001
- 56
57
58
59
60

For peer review only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 **Tables**
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1. Demographic and clinical characteristics of healthy and preeclamptic mothers and newborns.

For peer review only

Mothers	Healthy group, n=146 Median [Q1-Q3], no. (%)	Preeclamptic group, n=21 Median [Q1-Q3], no. (%)
Age (years)	23.5 [18 – 29]	21 [18 – 28]
Public sector	118 (80.8)	21 (100)
Gravidity 1	70 (47.9)	12 (57)
Gravidity >1	76 (52)	9 (43)
Abortion 1	19 (13)	2 (9)
Abortion >1	4 (2.7)	1 (4.8)
Gestational age (weeks)	39.5 [38.5 – 40.2]	38.4 [37.2 – 40.2]
Spontaneous labour	76 (52)	14 (66.7)
Induced labour	70 (48)	7 (33.3)
Spontaneous ruptures of membranes	87 (59.6)	17 (81)
Artificial rupture of membranes	59 (40.4)	4 (19)
Epidural analgesia	141 (96.6)	20 (95.2)
Normal delivery	79 (54.1)	3 (14.3)
Caesarean section	67 (45.9)	18 (85.7)
Newborns		
Male	79 (54.1)	6 (28.6)
Apgar score at 0 minutes	8 [8 – 9]	8 [8 – 8]
Apgar score at 5 minutes	9 [9 – 9]	9 [9 – 9]
Weight (kg)	3.3 [3.0 – 3.5]	3 [2.7 – 3.3]
Estimated gestational age by Dubowitz score (weeks)	39.2 [38.4 – 40.1]	38.3 [37 – 39.6]
Complicated delivery	23 (15.8)	7 (33.3)
Cyanosis	0	5 (23.8)

Respiratory distress	0	3 (14.2)
Nursery	146 (100)	18 (85.7)
Neonatal intensive care unit	0	3 (14.2)

For peer review only

Table 2 Differences in BNP concentrations (Mann-Whitney U test).

	Healthy newborns			Preeclampsia-associated newborns		
	BNP Median (Q1-Q3)	Z-score	p-value	BNP Median (Q1-Q3)	Z-score	p-value
Overall BNP	12.1 (7.7-16.8)	-	-	20.8 (5.8-46.4)	2.08	0.037
Sex						
Male	12.0 (7.5-16.9)	0.16	0.91	11.15 (5.0-49.5)	0.70	0.51
Female	12.2 (8.4-16.0)			22.3 (9.9-45.1)		
Delivery						
Spontaneous	11.8 (7.7-16.0)	0.57	0.56	21.5 (11.6-36.4)	-0.37	0.74
Induced labour	12.5 (8.3-17.4)			6.3 (5.0-57.6)		
Analgesia						
Epidural analgesia	11.8 (7.7-16.6)	-1.71	0.08	18.4 (5.5-41.9)	-1.15	0.38
Non-analgesia	14.3 (12.7-27.7)			54.5 (54.5-54.5)		
Delivery method						
Vaginal delivery	11.2 (6.8-15.3)	2.36	0.01	32.6 (15.1-32.6)	-0.90	-0.41
C-section	13.8 (8.9-18.1)			18.4 (5.2-45.7)		
Membrane rupture						
Spontaneous	11.7 (7.2-15.8)	1.93	0.05	20.8 (8.1-38.8)	0.09	1
Artificial rupture of membranes	13.8 (8.7-19.2)			31.3 (5.0-61.3)		
Complications						
Delivery complications	8.9 (6.7-13.7)	-1.57	0.11	47.9 (12.2-62.6)	2.09	0.038
Normal delivery	12.3 (8.3-16.8)			15.5 (5.0-25.4)		

1
2
3 **Figure captions**
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- **Figure 1.** Flow diagram of study and BNP values.
- **Figure 2A.** Shows the distribution of the BNP values in HN group. The right-skewed distribution was related to the detection range of the equipment (5 pg/mL). Thus, a logarithmic transformation was performed. However, the distribution remains right-side skewed (Figure 2B). **Figure 2B.** Consequently, the reference interval was estimated using the rank-based method for non-parametric distribution.
- **Figure 3A.** Box plot of reference interval of the healthy newborn, based on 2.5th and 97.5th percentiles is 5 - 34 pg/mL. (95% CI 5 - 38.8 pg/mL.) **Figure 3B.** BNP values in HN and PAN group (whiskers represent 2.5th and 97.5th percentiles).

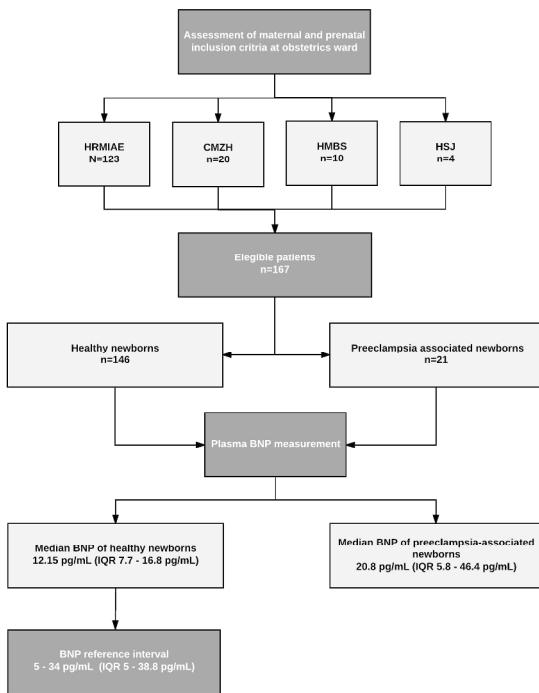
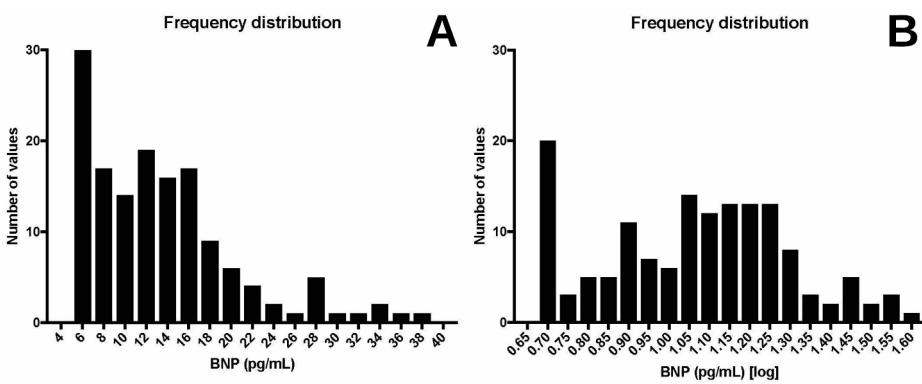


Figure 1. Flow diagram of study and BNP values

279x215mm (300 x 300 DPI)



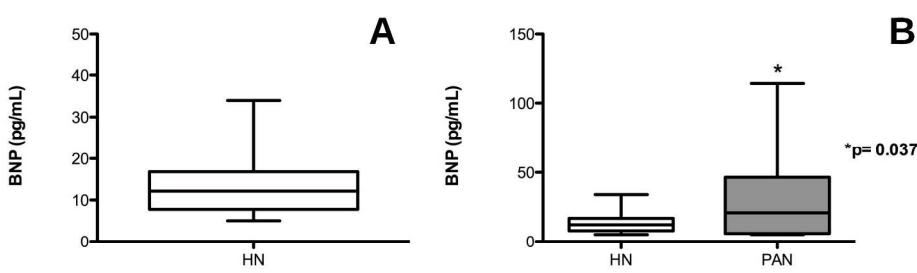


Figure 3A. Box plot of reference interval of the healthy newborn, based on 2.5th and 97.5th percentiles is 5 - 34 pg/mL. (95% CI 5 - 38.8 pg/mL.) Figure 3B. BNP values in HN and PAN group (whiskers represent 2.5th and 97.5th percentiles).

279x215mm (300 x 300 DPI)

Protocolo EBNPRNS01

“Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”.

Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Departamento de Cardiología Pediátrica.
Instituto de Cardiología y Medicina Vascular
Centro Médico Zambrano Hellion- Tec Salud
Email: jmysanchez@itesm.mx

Tabla de contenidos

Síntesis	5
Planteamiento del problema	7
Antecedentes	8
Justificación	8
Objetivo	8
Diseño de estudio	9
Metodología del estudio.....	10
<i>Materiales</i>	10
<i>Lugar donde se realizará el estudio</i>	10
<i>Universo, muestra y tamaño de la muestra</i>	10
<i>Método de selección de pacientes</i>	11
<i>Criterios de inclusión, exclusión y suspensión de los participantes</i>	11
<i>Análisis de observaciones</i>	11
<i>Técnicas, procedimientos y métodos de confiabilidad</i>	12
<i>Diseño general del estudio</i>	13
<i>Calendarización del estudio</i>	13
<i>Manejo de datos</i>	14
Aspectos éticos.....	14
<i>Clasificación de la investigación</i>	14
<i>Revisión por comité de ética</i>	14
<i>Información y Consentimiento</i>	15
<i>Riesgos previsibles y probables</i>	15
<i>Eventos Adversos</i>	15
<i>Protección frente al riesgo físico y/o emocional</i>	15
<i>Confidencialidad (Archivo Confidencial de la investigación)</i>	15
Diseminación de Datos y Publicación	16
Organización.....	16
<i>Recursos humanos</i>	16
<i>Recursos materiales</i>	17
<i>Capacitación del personal</i>	17
Financiamiento	17
<i>Origen del material</i>	17
Bibliografía	18
Anexos	19
<i>Formato de historia clínica EBNPRNS01</i>	19
<i>Formato resultado PNC EBNPRNS01</i>	20
<i>Consentimiento informado para los padres</i>	21

Datos de identificación

Protocolo: EBNPRNS01.

Titulado: "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano".

Investigador Principal.

Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Cardiólogo Pediatra. Instituto de Cardiología y Medicina Vascular. Centro Médico Zambrano Hellion – Tec Salud.

Batallón de San Patricio 112. Col. Real San Agustín. San Pedro Garza García, N.L. México.

Tel: 88880000

Co – investigador.

Dr. Héctor David Rodríguez Flores.

Médico Pasante en Servicio Social del Tecnológico de Monterrey.

Co- investigador.

Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz.

Cardiólogo FCCP. FACC. Instituto de Cardiología y Medicina Vascular. Centro Médico Zambrano Hellion – Tec Salud.

Departamentos participantes.

Cardiología Pediátrica del Instituto de Cardiología y Medicina Vascular.

Instituciones participantes.

Hospital San José – Tec Salud.

Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad – SSANL.

Hospital Metropolitano "Bernardo Sepúlveda" – SSANL.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

For peer review only. <http://bmjopen.bmjjournals.org/site/about/guidelines.xhtml>

1
2 Área de investigación.
3
4

5 Cardiología pediátrica, biomarcadores, recién nacido.
6
7

8 Línea de investigación.
9

10 Biomarcadores en recién nacido.
11
12

13 ¿En qué rama se realizará el estudio?
14

15 Cardiología pediátrica y biomarcadores.
16
17

18 Fecha probable de inicio y terminación del estudio.
19

20 Febrero de 2014 al 30 de Junio del 2014.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en
el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez. 4
For peer review only <http://bmjopen.bmjjournals.org/site/about/guidelines.xhtml>

Síntesis

Título	Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano.
Lugar de investigación	<ul style="list-style-type: none"> • Hospital San José – Tec Salud. • Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad – SSANL. • Hospital Metropolitano “Bernardo Sepúlveda” – SSANL.
Investigadores	<p>Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez. Dr. Héctor David Rodríguez Flores. Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz.</p>
Patrocinador	Instituto de Cardiología y Medicina Vascular – Centro Médico Zambrano Hellion.
Estudio clínico número	EBNPRNS01.
Aprobación del Comité de Ética	Aprobado.
Objetivos	Definir, establecer y verificar los valores del PNC del recién nacido en un sector de la población mexicana del estado de Nuevo León. Con la finalidad de determinar la utilidad clínica de este biomarcador en el paciente neonatal.
Diseño del estudio	<p>Clasificación del estudio: Original. Tipo de investigación: Observacional Características del estudio: Transversal. Tipo de análisis: Descriptivo. En relación al tiempo: Prospectivo.</p>

Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Sujetos	<p>Inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hijos e hijas de madres aparentemente sanas de entre 15 y 36 años de edad sin diabetes ni patologías asociadas al embarazo. • Control prenatal adecuado: 5 consultas mínimo (OMS). • Edad gestacional a término: (38-42 sdg). <p>Exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hijos e hijas de madre con patología previamente conocida. • Hijos e hijas con cromosomopatía detectada durante el control prenatal. <p>Suspensión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Detección durante el estudio de alguno de los criterios de exclusión. • Decisión de los padres de abandonar el estudio.
Mediciones	Medición del PNC extraído del cordón umbilical en el minuto 0 (cero) del nacimiento.
Muestra	Tamaño de la muestra: 146.
Análisis de observaciones	Método no paramétrico de estimación. Prueba de Dixon para el análisis de las observaciones atípicas.

Planteamiento del problema

Los biomarcadores cardiacos son capaces de darnos información relevante sobre la estructura y función del miocardio y pueden ayudarnos a identificar enfermedades y su repercusión a nivel celular en el recién nacido a término¹. Entre los biomarcadores más utilizados se encuentran: los péptidos natriuréticos y troponinas. Los primeros están relacionados con el estrés cardiaco y tensión ventricular, mientras que las últimas están relacionadas con daño agudo del miocito.

La determinación de péptido natriurético cerebral (PNC) es utilizada como herramienta para el diagnóstico y pronóstico en el adulto con insuficiencia cardiaca derecha o izquierda con o sin función sistólica preservada, cardiomielitis hipertrófica, remodelación ventricular post infarto y displasia arritmogénica del ventrículo derecho.

Después del nacimiento, el ventrículo derecho del neonato se expone a una mayor presión pulmonar, por lo tanto, los niveles elevados del PNC estimulan la vasodilatación y la diuresis, desempeñando un papel fundamental en la adaptación hemodinámica después del nacimiento. La disminución de la presión pulmonar, debido a la expansión pulmonar, y el inicio de la diuresis con la maduración renal explican la subsecuente disminución de los valores del PNC. Sin embargo, el incremento en el uso de este biomarcador en la práctica clínica en nuestro medio justifica conocer valores de referencia , y estandarizar el método de medición. Lo cual haría posible su utilización con fines clínicos en el paciente neonatal con lo que podría mejorarse la calidad de la atención.

Antecedentes

Los valores normales del PNC en pediatría cada vez se definen más, tanto en cardiopatías congénitas como en adquiridas. Koch y cols., reportaron la variabilidad que tienen en la etapa neonatal⁴. Law y cols sugieren en neonatos como cifras normales 170 pg/ml y para niños mayores a esta edad 41 pg /ml; este corte tiene sensibilidad de 94% y especificidad de 87%².

Justificación

La medición del PNC adquiere gran relevancia, ya que puede ayudar en la práctica clínica a establecer la diferencia entre enfermedades pulmonares, infecciosas o metabólicas de aquellos con insuficiencia cardíaca izquierda con o sin función sistólica preservada de diversa etiología⁵, e iniciar un abordaje terapéutico temprano y específico que repercute de en el pronóstico del paciente.

Sin embargo, ningún estudio ha podido estandarizar los valores de corte normales para el neonato sano. Es por esto que se propone estandarizar el PNC en el paciente neonatal en nuestro medio.

Objetivo

Definir, establecer y verificar los valores del PNC del recién nacido en un sector de la población mexicana del estado de Nuevo León. Con la finalidad de determinar la utilidad clínica de este biomarcador en el paciente neonatal.

Diseño de estudio

Clasificación del estudio: Original.

Tipo de investigación: Observacional

Características del estudio: Transversal.

Tipo de análisis: Descriptivo.

En relación al tiempo: Prospectivo.

Metodología del estudio

Población: Recién nacidos sanos de madres entre los 15 y 36 años de edad, sin patología conocida previamente ni asociada al embarazo que cumplan con los criterios de inclusión.

Materiales

Kit de extracción de sangre: Lavander top. Invert 8 – 10x. Spray – dried potassium EDTA.
Hielera con geles de congelación para preservar las muestras a 4°C.
RayBio® sandwich ELISA kit ELH-BNP-001. RayBiotech Inc.
Lector Multi-modal de Microplacas Synergy HT™– BioTek Instruments™. Centrifuga Allegra 25R® – Beckman Coulter Inc.

Lugar donde se realizará el estudio

El estudio está proyectado a realizarse en los hospitales e instituciones de salud pertenecientes al programa de residencias médicas del Sistema Tec Salud: Hospital San José-Tec de Monterrey (Tec Salud), Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad (SSANL) y Hospital Metropolitano “Bernardo Sepúlveda”(SSANL).

Universo, muestra y tamaño de la muestra

Universo: Recién nacidos sanos de madres entre los 15 y 36 años de edad, sin patología conocida previamente ni asociada al embarazo que cumplan con los criterios de inclusión.

Muestra: Única y obtenida del cordón umbilical en el minuto 0 (cero) posterior al parto o cesárea.

Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2
3 **Tamaño de la muestra:** 146 pacientes que cumplan con los criterios de inclusión
4 establecidos para este proyecto⁶.
5
6
7
8

9 **Método de selección de pacientes**

10 Se seleccionarán a los recién nacidos sanos de madres entre los 15 y 36 años de
11 edad, sin patología conocida previamente ni asociada al embarazo que cumplan con
12 los criterios de inclusión.
13
14

15
16 Por consentimiento informado: el estudio se realizará sólo en los recién nacidos que
17 cuenten con un consentimiento informado debidamente llenado y firmado por los
18 padres o tutores (se anexan formatos).
19
20
21
22
23
24

25 **Criterios de inclusión, exclusión y suspensión de los participantes.**

26 **Inclusión:** Recién nacidos sanos de madres aparentemente sanas de entre 15 y 36
27 años de edad sin diabetes ni patologías asociadas al embarazo con control prenatal
28 adecuado de 5 consultas y edad gestacional a término: (38-42 sdg).
29
30

31 **Exclusión:** Recién nacidos de madres con patología previamente conocida y recién
32 nacidos con cromosomopatía detectada durante el control prenatal.
33
34

35 **Suspensión:** Detección durante el estudio de alguno de los criterios de exclusión o si
36 los padres deciden no participar más en el protocolo.
37
38
39

40 **Análisis de observaciones.**
41
42

43 El método de análisis que se utilizará para la determinación del intervalo de
44 referencia será el método no paramétrico de estimación, ya que no hace ninguna
45 suposición específica acerca de la distribución de probabilidad de los valores de
46 referencia observados. La evaluación de las observaciones atípicas será mediante la
47 prueba de Dixon⁶.
48
49
50

51
52
53
54
55
56
57 **Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”.** Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
58 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
59
60

Técnicas, procedimientos y métodos de confiabilidad

Método para Determinar los niveles séricos o tisulares del péptido natriurético cerebral (PNC, por sus siglas en inglés).

El método para la determinación de los niveles séricos de PNC está basado en la inmunodetección. Para la realización de este proyecto utilizaremos el método de inmunodetección en placa conocido como ELISA.

ELISA

Fundamento: el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas o ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es una técnica de inmunoensayo en la cual un anticuerpo unido a una enzima se utiliza para detectar los niveles del antígeno en cuestión. La técnica de ELISA tipo sándwich consiste en colocar un anticuerpo para nuestro antígeno (proteína de interés), un segundo anticuerpo conocido como anticuerpo anti-antígeno marcado (unido a una enzima, peroxisada) y un sustrato que utilizará dicha enzima, para provocar un cambio en la coloración, misma que será medida a través de espectrofotometría indicando por consiguiente, de una manera indirecta, la cantidad de antígeno presente.

Técnica: En una placa de 96 pozos, se coloca el anticuerpo dirigido para la captura de PNC (anti-PNC, sc-391192), se deja 16 hrs a temperatura de 4°C, con la finalidad de absorber el anticuerpo a la placa. Posteriormente la placa se lava con buffer de PBS pH 7.2 +/-0.2 y se bloquean los sitios libres de la placa con BSA al 1% en PBS-T (0.05%) durante una hora, con la finalidad de evitar la adherencia inespecífica del antígeno. Posteriormente se coloca la muestra de interés para capturar el PNC presente. Se deja incubar por un período de dos horas. Finalmente se coloca el anticuerpo secundario y se revela con avidina conjugada con peroxidasa por 30 minutos utilizando como sustrato ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, sc-251817). La absorbencia se mide a 405 y 650 nm. Las concentraciones de proteína se obtienen utilizando como estándar PNC comercial (B7313 SIGMA).

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Diseño general del estudio

De inicio a término, este proyecto está contemplado para una duración de 5 meses, dividiéndose en tres fases:

1. Primera fase, con duración de tres meses para la recolección y procesamiento de muestra y almacenamiento de datos.
2. Segunda fase, con duración de tres meses para el análisis estadístico de los datos recolectados mediante la creación de base de datos.
3. Tercera fase, con duración de dos meses para el análisis de resultados y la creación del reporte final en búsqueda de su publicación para su difusión dentro de la comunidad científica.

Tras la recolección y refrigeración de las muestras, deberán ser transportadas al laboratorio (ICMV) para su procesamiento.

Para el almacenamiento y análisis de datos se creará una base de datos que reúna las variables significativas del paciente con la finalidad de permitir un estudio estadístico eficiente. Además de mantenerse apagado a los lineamientos de confidencialidad y privacidad del paciente.

Calendarización del estudio

	2014				
	F	M	A	M	J
Recolección de muestra y datos	1	1	1		
Análisis estadístico		2	2	2	
Reporte de resultados			3	3	

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

- 1
2
3 ● **Fase 1:** Febrero 2014- Abril 2014:
4 ○ Recolección de muestra y almacenamiento de datos obtenidos tras el
5 procesamiento en laboratorio.
6
7 ● **Fase 2:** Marzo 2014 – Mayo 2014:
8 ○ Creación de base de datos para análisis estadístico.
9 ○ Análisis de resultados.
10
11 ● **Fase 3:** Mayo 2014 – Junio 2014:
12 ○ Elaboración de reporte final.
13 ○ Difusión dentro de la comunidad científica.
14
15
16
17
18
19
20
21

Manejo de datos

Solamente los investigadores tendrán acceso a los datos recopilados durante el estudio.

La recolección de muestras sanguíneas será realizada por el co-investigador. La recopilación final de datos será realizada por el investigador principal. La identidad de los sujetos en cuestión será manejada como confidencial en todo momento y se les otorgara un número que servirá como identificación. Ninguna persona ajena a la investigación podrá alterar, utilizar o divulgar la información recolectada

Aspectos éticos

Clasificación de la investigación

Según el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Artículo N° 17: Investigación con riesgo mínimo.

Revisión por comité de ética

Los investigadores se comprometen a someter el presente protocolo así como consentimiento informado al comité de ética. En caso de cambios en el protocolo el equipo de investigación se compromete a informar al comité de ética, lo mismo aplica en caso de presentarse alguna eventualidad durante el desarrollo del mismo.

Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1 2 **3 Información y Consentimiento**

3
4 Como requisito fundamental para formar parte del estudio, los padres del recién
5 nacido deben leer y firmar un consentimiento informado.
6
7

8 El documento en cuestión se encuentra redactado en terminología simple para
9 facilitar la comprensión del personal no médico. Se leerá y firmará durante el primer
10 contacto del investigador con los padres del recién nacido, previo a la recolección de
11 la muestra, en el cual los padres podrán externar sus comentarios y dudas respecto
12 al estudio.
13
14

15 16 17 18 **19 Riesgos previsibles y probables**

20 Debido a que el estudio está enfocado en la recolección de sangre del cordón
21 umbilical, se considera el riesgo de punción del personal encargado de la toma de la
22 muestra.
23
24

25 26 27 **28 Eventos Adversos**

29 Se definirá como evento adverso a cualquier situación o eventualidad que ponga en
30 riesgo el bienestar físico, emocional o social del participante en el estudio. En caso
31 de que se presenten eventos adversos el investigador principal se compromete a dar
32 aviso al comité de ética para buscar una recomendación.
33
34

35 36 37 **38 Protección frente al riesgo físico y/o emocional**

39 Toda la información recabada se manejará con absoluta discreción; tratándose como
40 información confidencial, de acuerdo a las reglas éticas de la institución
41 correspondiente.
42
43

44 45 46 **47 Confidencialidad (Archivo Confidencial de la investigación)**

48 En el manejo y archivo de los datos de los sujetos que participen en esta
49 investigación seguiremos lo indicado por la Ley Federal de Protección de Datos
50 Personales en Posesión de los Particulares del siguiente modo:
51
52

53 Toda la información de los pacientes asignados al protocolo será resguardada en el
54 expediente clínico de este, se les identificará con un número, el cual conocerán los
55 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 15
56 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
57 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
58
59
60

padres y sólo los investigadores tendrán acceso a éstos. Se protegerán los datos personales de los pacientes, de manera tal que sólo se utilizará el número asignado al paciente para identificación de muestras, estudios y no serán utilizados éstos para ningún otro protocolo o investigación.

No existirá remuneración económica por participar en este estudio. Queda bajo la responsabilidad de los médicos tratantes el cuidado y manejo de los recién nacidos que participen en el estudio.

Diseminación de Datos y Publicación

Al contar con los resultados del estudio, se presentarán dentro de la comunidad científica en alguna de las revistas indexadas en las áreas de pediatría y cardiología. Como autores aparecerán el Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez (investigador principal), Dr. Héctor David Rodríguez Flores (co-investigador) y el Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz (co-investigador).

Organización

Recursos humanos

Nombre del personal	Cargo	Funciones del personal	Tiempo de actividad
Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez	Cardiólogo pediatra ICMV - CMZH	Análisis de resultados, firma del consentimiento informado. Explicación de pormenores del estudio.	3 años
Dr. Héctor David	Médico Pasante en	Recolección de	3 años

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

For peer review only. <http://bmjopen.bmjjournals.com/site/about/guidelines.xhtml>

Rodríguez Flores	Servicio Social del Tec de Monterrey	muestras, análisis de resultados, firma del consentimiento informado. Explicación de pormenores del estudio.
Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz	Director de Investigación Clínica del ICMV - CMZH	Asesoramiento en la investigación. 3 años

Recursos materiales

Materiales

- Kit de extracción de sangre: Lavander top. Invert 8 – 10x. Spray – dried potassium EDTA.
- Gradilla para colocación de tubos de muestras.
- Hielera.
- Geles de congelación.
- RayBio® sandwich ELISA kit ELH-BNP-001. RayBiotech Inc.

Aparatos

- Lector Multi-modal de Microplacas Synergy HT™ - **BioTek Instruments™**.
- Centrifuga Allegra 25R™ **Beckman Coulter Inc.**

Capacitación del personal

El Dr. Héctor David Rodríguez Flores cuenta con la capacitación requerida para la recolección y procesamiento de las muestras de sangre del cordón umbilical.

Financiamiento

Origen del material

Los recursos a utilizar son otorgados por la Cátedra de Cardiología del Instituto de Cardiología y Medicina Vascular del Centro Médico Zambrano Hellion. Participar en el estudio no genera ningún costo al paciente.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Bibliografía

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
1.- Vijlbrief, D. B. (2012). Use of biomarkers in neonatology. *Pediatric Research*, 337-343.
2.- Law YM, Hoyer AW, Reller MD, Silberbach M (2009). Accuracy of plasma B-type natriuretic peptide to diagnose significant cardiovascular disease in children. *J Am Coll Carol* 54:1467-1475.
3.- Smith, J. Goetze, JP, Andersen CB, Vejlstrup N (2010). Practical application of natriuretic peptides in paediatric cardiology. *Carol Young* 20:352-363.
4.- Koch, A. Zink, S. Singer, H. (2006) B-type natriuretic peptide in paediatric patients with congenital heart disease. *European Heart Journal* 27: 861-866.
5.- Yáñez, J. Rodriguez, D. Treviño, C. Valdez, A. Sánchez, CJ. (2013). Stress Transient Hypertrophic Cardiomyopathy and B-Type Natriuretic Peptide Role. *Pediatric Cardiology* 34:702-706. Springer.
6.- CLSI. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
7.- Katayev Alex, C. B. (2010). Establishing Reference Intervals for Clinical Laboratory Test Results. Is There a Better Way? *Clinical Chemistry* .
8.- Lab Medicine. (2009). Determining Laboratory Reference Intervals: CLSI Guideline Makes the Task Manageable. *ASCP Lab Medicine* , 40 (2), 75-76.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2
3
4
5
6
7
Anexos

8
9
10 **Formato de historia clínica EBNPRNS01**

11
12 **Historia clínica del recién nacido. EBNPRNS01**

13 Fecha: Número participante:

14 Nombre de la madre:

15 Nombre del padre:

16 **Madre**

17 Edad: Tipo de sangre: G ___ P ___ C ___ A ___ VDRL/RPR

18 Comorbilidades:

19 **Embarazo**

20 Lugar y número de consultas del control prenatal:

21 Complicaciones durante el embarazo:

22 Medicamentos utilizados durante el embarazo:

23 **Labor y parto**

24 Trabajo de parto espontáneo o inducido:

25 Complicaciones del trabajo de parto:

26 Monitoreo fetal:

27 Ruptura de membranas: espontáneo o artificial.

28 Tiempo previo al parto:

Características:

29 Medicamentos, incluidos analgesia y anestesia.

30 Tiempo previo a parto.

31 Duración de fases de trabajo de parto.

32 Vaginal o cesárea.

33 APGAR 0/5.

34 Maniobras de resucitación.

35 **Recién nacido**

36 Peso al nacer: Edad gestacional:

37 Crecimiento intrauterino: Género:

38 Fecha y hora del nacimiento:

39 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
40 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2 Signos vitales.
3
4

- 5 • Temperatura:
6 • Frecuencia cardiaca:
7 • Frecuencia respiratoria:
8 • Glucosa capilar:
9 • Problemas: Cianosis, dificultad respiratoria.
10
11
12

13 Edad gestacional estimada por Ballard.
14

- 15 • Física:
16 • Neuromuscular:
17
18
-

19
20
21
22
23
24 Nombre y firma de quien elaboró cuestionario
25
26

27
28
29
30 Formato resultado PNC EBNPRNS01
31
32

33 Resultado de PNC. EBNPRNS01
34
35

36 Fecha:
37
38

39 Número de participante:
40
41

42 PNC (0):
43
44

45 Lugar de procesamiento de la muestra
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez. 20
For peer review only <http://bmjopen.bmjjournals.org/site/about/guidelines.xhtml>

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Consentimiento informado para los padres

CONSENTIMIENTO INFORMADO

“Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”

Nombre de los investigadores:

Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
Dr. Héctor David Rodríguez Flores.
Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz.

Dirección del sitio de investigación:

Centro Médico Zambrano Hellion. Batallón de San Patricio No. 112, Colonia Residencial San Agustín. CP 66278. San Pedro Garza García. N. L., México.

Número de teléfono durante el día: 88-88-05-00.

Numero de teléfono 24 Horas: 8183668143 – 8117805441.

Introducción

A través de este documento queremos hacerle una invitación a participar voluntariamente en un estudio de investigación clínica, el cual tiene como objetivo principal:

Definir, establecer y verificar los valores del PNC del recién nacido en un sector de la población mexicana del estado de Nuevo León. Con la finalidad de determinar la utilidad clínica de este biomarcador en el paciente neonatal.

Antes de que usted acepte la participación de su hijo(a) en este estudio, se le presenta este documento de nombre “Consentimiento Informado”, que tiene como objetivo comunicarle de los posibles riesgos y beneficios para que usted pueda tomar una decisión informada.

El consentimiento informado le proporciona información sobre el estudio al que se le está invitando a participar, por ello es de suma importancia que lo lea cuidadosamente antes de tomar alguna decisión y si usted lo desea, puede comentarlo con quien desee (un amigo, un familiar de confianza, etc.) Si usted tiene preguntas puede hacerlas directamente a su médico tratante o al personal del estudio quienes le ayudarán a resolver cualquier inquietud.

Una vez que tenga conocimiento sobre el estudio y los procedimientos que se llevarán a cabo, se le pedirá que firme este documento para poder participar en el estudio. Su decisión es voluntaria, lo que significa que usted es totalmente libre de ingresar o no en el estudio. Podrá retirar su consentimiento en cualquier momento y sin tener que explicar las razones, sin que esto signifique una disminución en la calidad de la atención médica que se le proveerá , ni deteriorará la relación con su médico tratante.

Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Propósito del Estudio

El uso de biomarcadores representan una herramienta en el abordaje clínico de diversas patologías. La determinación de PNC es utilizada como herramienta para el diagnóstico y pronóstico en el adulto. Sin embargo, en pediatría aún no se logran determinar los valores de referencia de este biomarcador, por lo tanto, aún no está bien definida la utilidad clínica del mismo.

Por lo tanto, este protocolo busca definir, establecer y verificar dichos valores mediante la toma de muestras de sangre del cordón umbilical.

¿Cuántos pacientes participaran en el estudio?

146 pacientes que cumplan con los criterios de inclusión.

¿Cuánto durará su participación?

Durante su estancia intrahospitalaria.

¿Qué sucederá durante el estudio de Investigación?

Después de firmar el consentimiento informado se verificará que su hijo(a) cumpla con los siguientes **criterios de Inclusión**:

- Hijos e hijas de madres aparentemente sanas de entre 15 y 36 años de edad sin diabetes ni patologías asociadas al embarazo.
- Control prenatal adecuado: 5 consultas mínimo (OMS).
- Edad gestacional a término: (38-42 sdg).

Y que no presente ningún **criterio de exclusión**:

- Hijos e hijas de madres con patología previamente conocida.
- Hijos e hijas con cromosomopatía detectada durante el control prenatal.

Los siguientes son **criterios de suspensión** del estudio:

- Detección durante el estudio de alguno de los criterios de exclusión.
- Decisión de los padres de abandonar el estudio.

Procedimientos del Estudio

La recolección de muestra se realizará al momento del nacimiento, mediante la toma de una muestra de sangre del cordón umbilical, previo a ser cortado, independientemente de la vía de nacimiento (parto o cesárea).

Todas las recolecciones se llevarán a cabo previo al ingreso al área de cuneros.

Responsabilidades del Paciente

Proporcionar información acerca de su salud durante el estudio, especialmente cualquier evento adverso/cambios benéficos y en relación a su embarazo.

Reportar todos los síntomas independientemente de que estén relacionados o no con el estudio.

Reportar cualquier medicamento agregado o cambios a sus medicamentos prescritos.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2 Seguir las instrucciones del investigador respecto al medicamento y procedimientos
3 del estudio
4
5
6
7
8
9

Riesgos

10 **No existen riesgos para la madre o el recién nacido ya que la toma de muestras se**
11 **realizará directamente del cordón umbilical.**

13 Beneficios

14 El presente estudio **no representa ningún beneficio clínico para el paciente o sus**
15 **familiares.** Sin embargo, su participación es indispensable para el desarrollo del
16 estudio de biomarcadores, los cuales serán de gran utilidad para las generaciones
17 futuras.
18
19

20 ¿Qué opciones están disponibles aparte de participar en este estudio?

21 Ninguna.
22
23

24 Compensación por lesiones

25 No existe posibilidad alguna de sufrir alguna lesión ya que las muestras de sangre
26 serán obtenida del cordón umbilical del recién nacido.
27
28 De ninguna manera el firmar esta forma de consentimiento anula sus derechos
29 legales ni libera a los investigadores, patrocinador o instituciones participantes de su
30 responsabilidad legal y profesional.
31
32

33 ¿Participar en el estudio es voluntario?

34 Sí. Participar en este estudio de investigación es su decisión. Usted puede decidir no
35 participar o cambiar de opinión y después retirarse (abandonar). No habrá ninguna
36 penalidad y usted no perderá ningún beneficio que reciba ahora o que tenga
37 derecho a recibir.
38
39

40 Le diremos si contamos con información que pueda hacerlo cambiar de opinión
41 acerca de su participación en este estudio de investigación. Si usted desea
42 abandonarlo, deberá comentarlo directamente con el equipo de investigación.
43 Nos aseguraremos de que usted pueda terminar el estudio de la manera más segura.
44 En caso de ser necesaria, usted recibirá la atención de seguimiento adecuada.
45
46

47 El equipo de investigadores o el patrocinador del estudio pueden decidir retirarlo del
48 estudio sin su consentimiento si:
49
50

- 51 • **Usted no sigue las instrucciones de forma correcta.**
- 52 • **El equipo de investigadores decide que el estudio no es lo mejor para usted.**
- 53 • **El estudio es interrumpido por el patrocinador del estudio, el Consejo de**
54 Revisión Institucional (CRI) o el Comité de Ética Independiente (CEI); grupo
55 de profesionales en el área que revisan la investigación para proteger sus
derechos, o por una agencia regulatoria.

56 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 23
57 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
58 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
59
60

1
2
Costo de la participación

3
4
5
6
7
No habrá ningún costo por su participación en este estudio. El material en estudio,
8
9
10 los procedimientos relacionados con el estudio y las visitas del estudio serán
11 proporcionados sin ningún costo para usted o su compañía de seguros.
12
13

14 Usted será responsable por el costo de su atención médica habitual, incluidos los
15 procedimientos y/o medicamentos no relacionados con el estudio que el equipo de
16 investigadores o su médico tratante requieran durante el estudio como parte de su
17 atención médica habitual.
18
19

20 **¿Me pagarán por participar en este estudio?**
21
No recibirá ningún pago por participar en este estudio.

22 **Si participo en este protocolo de investigación, ¿Cómo se protegerá mi privacidad?**

23 **Confidencialidad**

24 Con su consentimiento, su médico tratante será informado que usted decidió
25 participar en este estudio de investigación.
26
27

28 Sus registros obtenidos mientras usted participa en este estudio, así como los
29 registros de salud relacionados, permanecerán estrictamente confidenciales en todo
30 momento. Sin embargo, tendrán que estar disponibles para, los miembros del
31 Comité de Ética Independiente y las autoridades médicas regulatorias.
32
33

34 Al firmar este consentimiento, usted otorga permiso para el estudio actual y
35 cualquier investigación posterior que pueda llevarse a cabo utilizando esta
36 información. Sin embargo, el equipo de investigadores tomará las medidas
37 necesarias para proteger su información personal, y no incluirá su nombre en ningún
38 formato, publicaciones o divulgación futura. Si se retira del estudio, no obtendremos
39 más información personal acerca de usted, pero podremos continuar utilizando la
40 información ya recopilada.
41
42

43 **Usted no será identificado en ninguno de los reportes o publicaciones que resulten**
de este estudio.

44 **SUS DERECHOS NO SON AFECTADOS BAJO NINGUNA LEY DE PROTECCIÓN DE LA**
INFORMACIÓN.

45 **¿A quién podré contactar si tengo preguntas del estudio o acerca de mis derechos?**
46 Antes de que usted firme este documento, deberá preguntar acerca de cualquier
47 cosa que no haya entendido. El equipo de investigadores responderá sus preguntas
48 antes, durante y después del estudio. Si usted piensa que su pregunta no ha sido
49 contestada completamente o si no entiende la respuesta, por favor continúe
50 preguntando hasta que esté satisfecho.
51
52

53 Si tiene alguna preocupación o queja acerca de este estudio o sobre cómo se está
54 realizando, por favor no dude en discutir sus preocupaciones con los investigadores:
55
56

57 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 24
58 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
59 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
60

1
2
3 Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez
4 Dr. Héctor David Rodríguez Flores
5 Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz
6
7
8
9

10
11 No firme este formato a menos que usted haya tenido la oportunidad de hacer
12 preguntas y de que haya obtenido respuestas satisfactorias a todas sus preguntas.
13
14

15 Este Consentimiento ha sido revisado por las Comisiones de Ética e Investigación de
16 la Fundación Santos y de la Garza Evia I.B.P. (Hospital San José) y de la Escuela de
17 Medicina Tecnológico de Monterrey.
18
19

20 **Si usted tiene alguna pregunta con respecto a sus derechos como un paciente de**
21 **investigación, usted puede comunicarse al (01) 81 8888210.**
22
23

FIRMAS

24 Marcar con una X si se cumplió con lo que se menciona.
25
26

- 27 He sido informado acerca del estudio y tuve mi primer diálogo con el médico del
28 estudio o el personal de la investigación acerca de dicha información el (Fecha)
29 _____ a la hora (si es necesario) _____. (La hora es necesaria
30 solamente si la información y el consentimiento fueron entregados el mismo día.)
31 He leído y entendido la información en este documento de consentimiento
32 informado.
33 He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas fueron
34 contestadas a mi satisfacción.
35 Consiento voluntariamente la participación de mi hijo(a) en este estudio. No
36 renuncio a ninguno de mis derechos legales al firmar este documento de
37 consentimiento.
38

39 **Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de este documento, que tiene #**
páginas.
40

41 Nombre del familiar del participante:
42

43 Firma del familiar del participante:
44

45 Fecha de la firma:
46
47

48 **Nombre del representante legalmente autorizado:**
49 Parentesco:
50

51 Firma del representante:
52

53 Fecha de la firma:
54
55

56 **Testigos Imparciales**

57 Nombre del Testigo Imparcial 1:
58

59 Dirección del Testigo Imparcial 1:
60 Parentesco:
61
62 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 25
el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez
For peer review only. <http://bmjopen.bmjjournals.com/site/about/guidelines.xhtml>

1
2 Firma del Testigo Imparcial 1:
3 Fecha:
4
5
6
7
8

9 Nombre del Testigo Imparcial 2:
10 Dirección del Testigo Imparcial 2:
11 Parentesco:
12 Firma del Testigo Imparcial 2:
13 Fecha:
14
15
16

17 **Persona que Obtiene el Consentimiento**

18
19
20

21 Nombre de la persona que condujo el proceso del consentimiento:
22 Firma:
23 Fecha de la firma:
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 * †El investigador o una persona adecuadamente calificada y capacitada designada
35 por el equipo de investigadores para dirigir el proceso de consentimiento informado
36 debe firmar y fechar la forma al mismo tiempo que el sujeto.
37

38 ‡Testigo imparcial: Una persona que es independiente al estudio, que no puede ser
39 influida injustamente por las personas involucradas con el estudio, que está
40 presente en el proceso de consentimiento informado si el sujeto o el representante
41 legalmente aceptable del sujeto no puede leer y que lee el consentimiento
42 informado y cualquier otra información escrita proporcionada al sujeto.
43 Guía E6 de Buenas Prácticas Clínicas para la Industria: Guía consolidada.
44

1
2
3
4 **STROBE 2007 (v4) Statement—Checklist of items that should be included in reports of cohort studies**
5

6 Section/Topic	7 Item #	8 Recommendation	9 Reported on page #
10 Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	2
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	2
Introduction			
13 Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	4
14 Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	4
Methods			
17 Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	4-5
18 Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	4-5
21 Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up	5
		(b) For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed	NA
24 Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	5-6
27 Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	5-6
29 Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	4-5
31 Study size	10	Explain how the study size was arrived at	6
32 Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	6
34 Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	6
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	6
		(c) Explain how missing data were addressed	7
		(d) If applicable, explain how loss to follow-up was addressed	NA
		(e) Describe any sensitivity analyses	NA
Results			7

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram	7 5
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest (c) Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	7 NA
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures over time	5
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	7 7
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	8
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	9
Limitations			
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	12-13
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	13
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	3

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

BMJ Open

B-type natriuretic peptide reference interval of newborns from healthy and preeclamptic women

Journal:	<i>BMJ Open</i>
Manuscript ID:	bmjopen-2018-022562.R1
Article Type:	Research
Date Submitted by the Author:	15-May-2018
Complete List of Authors:	Rodriguez, David; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Clinical Research; Instituto de Cardiologia y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Garcia-Rivas, Gerardo; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Laresgoiti-Servitje, Estibalitz; Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Ciencias Clinicas Yañez, Jesus; Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Torre-Amione, Guillermo; Instituto de Cardiologia y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Jerjes-Sanchez, Carlos; Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Clinical Research
Primary Subject Heading:	Paediatrics
Secondary Subject Heading:	Cardiovascular medicine
Keywords:	Biomarkers, BNP, reference interval, newborn, preeclampsia

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2 1 **B-type natriuretic peptide reference interval of newborns from healthy and preeclamptic**
3 2 **women**

4 4 David Rodriguez^{a,b}, Gerardo Garcia-Rivas^a, Estibalitz Laresgoiti-Servitje^c, Jesus Yañez^b, Guillermo
5 5 Torre-Amione^{a, b, d}, Carlos Jerjes-Sanchez^{a,b*}.

6
7 7 ^a*Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de*
8 *Medicina, Tecnologico de Monterrey, Mexico.*

9 9 ^b*Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la*
10 *Salud, Tecnologico de Monterrey, Mexico.*

11 11 ^c*Ciencias Médicas Clínicas, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de*
12 *Monterrey, Mexico.*

13 13 ^d*Methodist DeBakey Heart and Vascular Center, The Methodist Hospital, USA.*

14
15 15 **ORCID ID:**

- 16 16 • David Rodriguez: <https://orcid.org/0000-0002-0811-4235>
17 17 • Gerardo Garcia-Rivas: <https://orcid.org/0000-0003-4731-3293>
18 18 • Estibalitz Laresgoiti-Servitje: <https://orcid.org/0000-0002-3271-9955>
19 19 • Carlos Jerjes-Sanchez: <https://orcid.org/0000-0003-3222-7405>

20
21 21 ***Corresponding author:** Carlos Jerjes-Sanchez, Director of Clinical Research, Instituto de
22 22 Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud. Centro Medico Zambrano Hellion. Batallón San Patricio
23 23 112, Real de San Agustin, 66278 San Pedro Garza García, Nuevo Leon. México. Email:
24 24 jerjes@prodigy.net.mx, carlos.jerjes@udicem.org Telephone: +5281-88880000.

25 25 **Keywords:** Biomarkers; BNP; reference interval; newborn; preeclampsia

26 26 **Word count:** 3381.

27

1
2 **Abstract**

3 **Objective:** To define and compare the reference interval of BNP in healthy newborns from healthy
4 mothers and with severe preeclampsia.

5 **Design:** Prospective, multicenter, cross-sectional study.

6 **Setting:** Four obstetric wards of second-level academic hospitals.

7 **Participants:** 167 healthy newborns, from 146 healthy and 21 severe preeclamptic women. We
8 included newborns from healthy mothers with full-term pregnancies (38 to 42 gestational weeks),
9 who received adequate prenatal care, and who had Apgar scores ≥ 7 at 0 and 5 minutes. Newborns
10 with chromosomopathies identified during prenatal consultations, those with respiratory distress,
11 and those with cardiac or pulmonary disease detected in the first pediatric evaluation were excluded
12 from this study. In the group of preeclamptic women, we considered the same inclusion criteria, but
13 the patients also had to meet the diagnostic criteria for preeclampsia with severity features,
14 according to the ACOG guidelines. The same exclusion criteria used for the healthy group was
15 applied to the preeclampsia-associated newborn.

16 **Interventions:** A single blood sample from the umbilical cord artery after delivery (vaginal or
17 cesarean section).

18 **Primary outcome:** Reference level of BNP in healthy newborns.

19 **Results:** In the healthy newborns group, the median BNP was 12.15 pg/mL (IQR 7.7 – 16.8 pg/mL)
20 and in the preeclamptic group 20.8 pg/mL (IQR 5.8 – 46.5 pg/mL). The reference interval for BNP in
21 healthy newborns was 5 (95% CI 5-5) - 34 pg/mL (95% CI 28.4-38.8). We identified higher
22 expression of BNP in newborns from preeclamptic women overall ($p=0.037$, $r = 0.16$) and in
23 newborns exposed to stress conditions, such as complications during labor and delivery ($p=0.038$, r
24 = 0.45).

25 **Conclusions:** In healthy newborns, BNP concentrations at birth were lower than reported in other
26 similar populations. In neonates with stress conditions, the higher expression of this biomarker
27 establishes another possible link between stress and the cardiovascular response.

28 **Trial registration:** ClinicalTrials.gov: NCT02574806.

1
2 1 **Article summary**

3 2 **Strengths and limitations of this study**

- 4 3 • First prospective multicenter cohort study aimed to determine the reference interval of BNP
5 4 in the healthy newborn after delivery.
6 5 • Study population, sample size, and statistical analysis were defined according to the
7 6 guidelines from the Clinical & Laboratory Standards Institute.
8 7 • There were no serial measurements of BNP for follow-up.
9 8 • The study is limited only to BNP, due to its relevance as a marker of ventricular dysfunction.
10 9 • No imaging tools were used for structural and functional assessment.

11 10 Original protocol available at Supplementary material.

12 11 **Funding statement:** This study was supported by Endowed Chair in Cardiology (Tecnológico de
13 12 Monterrey, 0020CAT131); CONACYT (Grant 151136, 133591, 269399) and Xignus Research
14 13 Fund.

15 14 **Disclosure of interest:** None declared.

16 15 **Authors contribution:** D.R. contributed to the design and implementation of the protocol, the
17 16 analysis of the results, and the writing of the manuscript. G.GR contributed to the analysis of the
18 17 results and the writing of the manuscript. E.LS. contributed to the analysis of the results and the
19 18 writing of the manuscript. J.Y. contributed to the design of the protocol, the analysis of the results,
20 19 and the writing of the manuscript. G.TA. contributed to the design of the protocol, the analysis of the
21 20 results, and writing the manuscript. C.JS contributed to the design and implementation of the
22 21 protocol, the analysis of the results and the writing of the manuscript.

23 22 **Data sharing statement:** The authors do not have permission to share data since our informed
24 23 consent form did not inquire for permission to share data.

1 1 Introduction

2 Several studies have proved the B-type natriuretic peptide (BNP) as a promising diagnostic and
3 stratification biomarker in multiple clinical settings concerning the adult population [1]. In pediatric
4 patients with cardiac disorders, BNP is an essential tool for diagnosis, risk stratification, and
5 prognosis [2]. Since elevated expression of BNP in the pediatric population has been associated
6 with poor ventricular function and outcomes as seen in patent ductus arteriosus, persistent
7 pulmonary hypertension of the newborn, and stress transient cardiomyopathy [3,4]. However,
8 newborns have peak levels in the first days of life, which decrease within the first week and vary
9 greatly [5]. The published normal range of BNP and the amino-terminal segment of its prohormone
10 (NT-pro-BNP) appear to have an age- and gender-dependent trend [6]. The ample range of blood
11 concentrations of both biomarkers can be attributed to several perinatal factors that may be
12 influencing myocardial performance during the postnatal transition period [5,7–10]. Despite
13 aforementioned data [3,4], perhaps BNP, is not the best option as a biomarker in neonates [6]. On
14 the other hand, in newborns with acute respiratory distress, a normal BNP value may have a high
15 negative predictive value for ruling out ventricular dysfunction from other acute disorders (i.e.,
16 respiratory distress, sepsis, or metabolic alterations), improving the quality of medical care.
17 Additionally, preeclampsia is a vascular disorder that increases maternal and fetal/neonatal
18 morbidity and mortality [11], increases BNP expression [12] and has deleterious effects on the
19 cardiovascular system of the newborn [13]. Whether these maternal mechanisms influence the
20 expression of BNP in the newborn is an unmet question. Currently, BNP concentration has an
21 impact in early disease stratification. Nonetheless, its role and the normal concentrations in the
22 healthy neonatal population has not been elucidated. Also, the influence of maternal preeclampsia
23 on the cardiovascular system of the newborn is not well known. Therefore, we conducted the first
24 multicenter, cross-sectional study to establish the reference interval of BNP in healthy newborns
25 (HN), and thereafter compared BNP concentrations between newborns of healthy and preeclamptic
26 mothers.

27

28

1
2 1
3 2 **Methods**
4 3

5 **Study design**
6
7

8 A multicenter, prospective, cross-sectional study was designed to establish the reference interval of
9 BNP in HN at birth and to compare it with those in offspring of preeclamptic mothers. The study was
10 conducted at the obstetrics wards of four academic-hospitals, during the period from April 2014 to
11 April 2015. Medical health records were reviewed to assess the potential eligibility of each
12 participant, and a direct interview confirmed that all inclusion criteria were met. Inclusion criteria: 1)
13 newborns from healthy mothers with full-term pregnancies (38 to 42 gestational weeks), 2) who
14 received adequate prenatal care, and 3) who had Apgar scores ≥ 7 at 0 and 5 minutes. Exclusion
15 criteria 1) Newborns with chromosomopathies identified during prenatal consultations, 2) those with
16 respiratory distress, and 3) those with cardiac or pulmonary disease detected in the first pediatric
17 evaluation. In the group of preeclamptic women, we considered the same inclusion criteria, but the
18 patients also had to meet the diagnostic criteria for preeclampsia with severity features, according
19 to the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) guidelines. The same
20 exclusion criteria used for the HN group was applied to the preeclampsia-associated newborn
21 (PAN) group (Figure 1).

22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

19 We collected a single whole blood sample from the umbilical cord artery after delivery (vaginal or
20 cesarean section) in 4 mL spray-coated K2EDTA tubes (BD Vacutainer®), which was immediately
21 processed and analyzed eliminating need for storage. Arterial blood was preferred over venous
22 blood because this would allow a direct measurement of BNP concentration from the bloodstream
23 of the newborn. After determining the BNP reference interval in HN, this group was compared with
24 newborns from mothers with severe preeclampsia. Anthropometry and clinical status were obtained
25 from the records of attending pediatricians and neonatologists. All infants were evaluated in the
26 nursery ward during the first hours of the neonatal period to ascertain their health status. Written
27 informed consent was obtained from all mothers before newborns enrollment. This study was
28 conducted according to the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Research

1
2 1 Committees of the Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey. The trial
3 2 was registered in ClinicalTrials.gov: NCT02574806.
4
5

6 3 ***BNP measurement***
7
8

9 4 BNP was measured by using the Triage® MeterPlus and Triage® BNP Test (Alere™). The Triage
10 5 BNP assay is a rapid, point of care fluorescence immunoassay for the quantitative measurement of
11 6 BNP in potassium ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) anticoagulated whole blood or plasma
12 7 specimens [14]. In brief, the sample reacts with fluorescent antibody conjugates and flows through
13 8 the test device by capillary action. Complexes of fluorescent antibody conjugate are captured in a
14 9 specific area for BNP. BNP concentration in the specimen is directly proportional to the
15 10 fluorescence detected, and in approximately 15 minutes, a result is obtained. The measurement
16 11 range of the BNP assay is 5 pg/mL to 5000 pg/mL. A measurement range > 100 pg/mL is
17 12 determined as abnormal by the equipment referencing literature [14].
18
19

20 13
21 14 ***Study Definitions***
22
23

24 15 A healthy mother was considered as a biological female between 15 and 36 years old, without
25 16 chronic disease history or pregnancy-associated diseases. Adequate prenatal care was defined
26 17 using the World Health Organization criterion, consisting of at least five obstetric office visits.
27 18 Severe preeclampsia was diagnosed according to the American College of Obstetricians and
28 19 Gynecologists criteria which consists of: the presence of preeclampsia with systemic involvement,
29 20 including heart failure, visual or cerebral disturbances, thrombocytopenia, abnormal liver tests
30 21 and/or renal failure [15]. Complicated delivery was defined as prolonged labor (≥ 14 hours),
31 22 evidence of abnormal antenatal cardiotocographic records, no reassuring fetal status, amniotic fluid
32 23 abnormalities (i.e., volume disturbances, meconium), aspiration of meconium during birth or
33 24 umbilical cord compression.
34
35

36 25
37 26 ***Statistical analysis***
38
39

40 27 The sample size was determined based on the guidelines from the Clinical and Laboratory
41 28 Standards Institute, which establishes that the minimum sample of healthy reference subjects
42
43

1 required to obtain a reference interval with a 95% CI is 146 subjects [16–18]. Continuous variables
2 were expressed as mean \pm standard deviation. Furthermore, categorical variables were expressed
3 as numbers and percentages. All values are rounded to the nearest tenth decimal. Values of BNP
4 were shown as median and interquartile range (IQR). The reference interval of BNP in HN was
5 determined by estimation of the 2.5th and 97.5th percentile with 95% confidence interval (95%CI),
6 by parametric or non-parametric methods depending on BNP values distribution, as recommended
7 by Clinical and Laboratory Standards Institute [17]. For non-parametric continuous variables, we
8 used Mann-Whitney U test to compare BNP expression between groups. Chi-square tests for
9 association were conducted to evaluate percentage differences between categorical variables
10 among newborns from HN and PAN groups. A probability of alpha-error < 0.05 was considered for
11 significant results. Statistical analysis was performed using the Statistics Package for the Social
12 Sciences (SPSS) from IBM Corporation, version 22, and Stata/IC 14.2 for Mac (College Station,
13 TX). Graphs were made with Prism 7 for Mac OS X.

14

15 **Patient involvement**

16 No patients were involved in the planning of this research.

17

18 **Results**

19 From April 2014 to April 2015, 167 samples were collected in two hospitals from the public sector
20 and two from the private sector; 146 newborns were categorized as the healthy group, and 21 as
21 the preeclampsia group. The latter group was composed by newborns from mothers who developed
22 preeclampsia during the third trimester of pregnancy, requiring admission to the obstetric intensive
23 care unit (Table 1). Maternal population was younger, with all HN delivered at term, and high
24 incidence of spontaneous labor and rupture of membranes (Table 1). Both the HN and PAN groups
25 had similar proportions of nulliparous and multiparous mothers and small percentages of previous
26 miscarriages or abortions. A high rate of newborn deliveries in HN and PAN groups were performed
27 by cesarean section. We observed delivery complications in 15.8% and 33.3% neonates from the

1 HN and PAN group, respectively. From the PAN group, 24% neonates presented cyanosis and
2 14.2% respiratory distress. There was no missing data.

3
4 A non-normal distribution of BNP values was found both study groups by visual histogram
5 inspection and the Shapiro-Wilk test ($p<0.05$) (Figure 2). Therefore, we decided to follow a non-
6 parametric analysis approach to determine the reference interval and assess group differences in
7 BNP concentrations. In the healthy group, the BNP median was 12.15 pg/mL (IQR 7.7 – 16.8
8 pg/mL) and in the preeclamptic group 20.8 pg/mL (IQR 5.8 – 46.4 pg/mL). The reference interval of
9 BNP in healthy newborns based on 2.5th and 97.5th percentiles was 5 (95% CI 5-5) - 34 pg/mL
10 (95% CI 28.4-38.8) (Figure 3). Offspring from the PAN group had significantly higher BNP levels
11 compared to those in the HN ($p = 0.037$), with a small effect size, $r = 0.16$. Almost one third of the
12 PAN group (28.6%) were outside the reference range. Figure 3 shows BNP concentrations in HN
13 and PAN groups. Additionally, BNP concentrations between the HN and PAN groups according to
14 several maternal and newborn variables were compared by conducting Mann-Whitney U tests.
15 Children from the HN group delivered by C-section had significantly higher ($p=0.018$) BNP values
16 than those born by vaginal delivery, although with a small effect size, $r = 0.19$ (median 13.8 pg/ml,
17 IQR 8.9-18.1 pg/mL vs 11.2 pg/mL, IQR 6.8-15.3 pg/mL, respectively). The Mann Whitney U test
18 that evaluated BNP concentrations between newborns in the PAN group with and without delivery
19 complications was also significant, in the expected direction ($p=0.038$), and with a moderate effect
20 size, $r = 0.45$. Those babies with delivery complications had higher BNP values [median 47.9 pg/mL
21 (IQR 12.2-62.6 pg/mL)] compared to the ones with non-complicated deliveries [median 15.5 pg/mL
22 (IQR 5.0-25.4 pg/mL)]. Medians, interquartile range (IQR) and significant differences are shown in
23 Table 2.

24
25 Lastly, chi-square tests for association were conducted to evaluate percentage differences in labor
26 initiation, a method of membrane rupture, the use of analgesia during delivery, development of
27 delivery complications, the presence of cyanosis or respiratory distress, and admission to the
28 neonatal intensive care unit among newborns from HN and PAN groups. Analyses showed no

1 significant association with spontaneous or induced labor initiation ($p = 0.209$), the method of
2 membrane rupture ($p = 0.059$), use of analgesia during labor ($p = 0.75$), nor for the presence of
3 delivery complications ($p = 0.109$) with HN or PAN groups. However, significant association was
4 found between newborns born from preeclamptic mothers and the presence of cyanosis ($\chi^2(1) =$
5 3583, $p = 0.000$, Cramer's $V = 0.46$); the development of respiratory distress ($\chi^2(1) = 21.23$, $p = 0.000$,
6 Cramer's $V = 0.35$); and admission to neonatal intensive care unit ($\chi^2(1) = 21.23$, $p = 0.000$, Cramer's
7 $V = 0.35$).

9 Discussion

10 The results from this multicenter study provide three important observations regarding the use of
11 BNP concentrations in the pediatric population. Firstly, BNP concentrations were lower in healthy
12 offspring population at birth, compared to those observed in similar populations and lower than the
13 values detected in pediatric [7,19] and adult patients [12]. Secondly, higher BNP concentrations in
14 newborns with two stressors (i.e., preeclampsia and complicated delivery) contributes to elucidate
15 another link between stress and cardiac response [20]. Lastly, high peak levels of BNP
16 concentrations known to be present at birth, as a consequence of the physiological conditions of the
17 newborn, were not observed in our HN group.

18
19 BNP and the inactive NT-pro-BNP levels are reasonably correlated, and either of them can be used
20 in patient care. Although the usefulness of BNP concentrations in identifying different ventricular
21 dysfunction stages or mortality risks in the adult [21] and pediatric populations [4,7,19] has been
22 well established, studies in children are more challenging and remain limited than those in adults.
23 One of the most important factors promoting this limitation is the lack of normative biomarker values
24 in children [19]. Additionally, average adult BNP values vary depending on the assay method and
25 patient demographics; whereas appropriate reference values are lacking in children.

26
27 Our results show that in HN at birth, BNP concentration was lower [median 12.15 pg/mL (IQR 7.7 –
28 16.8 pg/mL)] than that reported in other neonate populations [96 pg/mL (mean 134 ± 130 pg/mL)]

1 without disease [7]. Although, in this study, newborns included had signs and symptoms of a
2 cardiovascular disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
3 illness with or without anatomic defect [7]. Most studies show high levels of BNP and NT-pro-BNP
4 immediately after birth, decreasing during the third or fourth day of life [22,23]. Other reports
5 indicate a tendency or significant decrease in BNP concentrations, suggesting that the peptide
6 levels are dependent on age, the assay used for its measurement, and possibly the gender [10].
7 Additionally, a BNP cut-off value of 170 pg/mL during the first 7 days of extrauterine life and value
8 of 41 pg/mL for those older than 7 days but younger than 19 years-old has been established [7].
9

10 In our results, BNP expression was independent of maternal characteristics including age, and
11 obstetric history. However, we did find increased BNP values in babies delivered by C-section, but
12 only in the HN group. This finding is in accordance with previous studies that have reported that
13 BNP expression was dependent on delivery method [22–24].
14

15 Even though the reason for higher NT-pro-BNP or BNP values soon after birth remains unknown,
16 several mechanisms have been considered, its role in the homeostasis, increased body water,
17 myocardium stiffness, etc. [7]. Moreover, newborns may be less responsive to natriuretic peptides,
18 so a higher secreted level may be required to promote the well-recognized natriuresis that
19 commences within the first week of life. During this time, the precipitous decrease in pulmonary
20 vascular resistance may also be promoted by natriuretic peptides [7]. On the other hand, our results
21 suggest that perinatal factors related to postnatal transition do not have any influence on myocardial
22 performance. Since current and strong evidences [25–27] support that BNP does not cross the
23 placental barrier, these values only reflect the myocardial performance of the newborn.
24

25 The whole blood BNP concentrations (median 12.15 pg/mL, IQR 7.7 – 16.8 pg/mL) observed in our
26 HN population were similar to BNP levels throughout pregnancy in healthy women [12], suggesting
27 that a BNP concentration > 20 pg/mL in pregnant women and newborns may indicate ventricular
28 stress and/or subclinical cardiac dysfunction. Currently, in adult patients ventricular dysfunction is
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1 unlikely when BNP concentrations are < 100 pg/mL. However, some studies have suggested that a
2 cut-off value of 50 pg/mL, rather than 100 pg/mL, will increase its sensitivity and negative predictive
3 value in adult or pediatric populations [28]. The clinical implications of our findings suggest that in
4 newborns a reference interval of 5 (95% CI 5-5) - 34 pg/mL (95% CI 28.4-38.8) instead of < 100
5 pg/mL could increase its sensitivity and the negative predictive value reducing the proportion of
6 false positives. BNP expression superior to the obtained reference interval could be considered as
7 a gray zone of this biomarker, without clinical relevance in early phases. However, if this abnormal
8 expression could have further clinical implications is an unsolved question. It is possible that the
9 lower BNP concentrations observed in our study, as suggested by other observations
10 [3,7,10,29,30], may depend on racial or genetic characteristics. Recently, results support this
11 consideration based on higher BNP concentrations (32.02 ± 3.37 pg/mL, mean \pm SE) compared to
12 our HN population [31]. However, the mechanisms behind this finding remain as an unresolved
13 question.

14
15 Another relevant result was higher BNP concentrations in neonates under two stressors (maternal
16 preeclampsia and delivery complications), compared to HN (median 37.1, IQR 36.2 – 39.2 pg/mL,
17 vs 12.15, IQR 7.7 – 16.8 pg/mL, $p=0.038$) despite a good adaptation to extrauterine life, since BNP
18 concentrations were not associated with need for a specialist consultation, NICU transfer, death, or
19 congenital cardiac disease. Although the stress role in cardiovascular disorders has been well
20 established [20], its participation in other pediatric clinical models [21] is still uncertain. Since there
21 is an embryologic link between neurologic diseases and cardiomyopathy (common
22 neuroectodermal origin), catecholaminergic overexpression in neuroendocrine disease may elicit an
23 abnormal response in the myocardial adrenergic receptors. Thus, in early stages, if this
24 overexpression is not sustained, cellular disarray could induce higher BNP concentrations. In late
25 stages, and under conditions of continued stress, this mechanism could be linked to several models
26 of transient hypertrophic cardiomyopathy [21].

27

1
2 1 Lastly, although despite previous evidence establishing different BNP concentrations depending on
3 the type of delivery [22–24] and by the presence of preeclampsia [2], our results did not reproduce
4 these observations. Our study group only showed increased BNP concentrations in neonates who
5 were born by C-section from healthy mothers. Also, no differences among delivery type and BNP
6 concentrations were identified.

7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60 There are several potential limitations of our study. A major limitation was the lack of long-term
follow-up of the offspring, with pediatric visits and blood draws to establish serial measurements of
BNP which could help determine its prognostic value of BNP for cardiovascular conditions during
different stages of growth and development along with its relevance for chronic diseases. However,
our aim was only to focus on the assessment of BNP expression in the HN as a tool for clinical
assessment in the compromised neonate. Additionally, maternal BNP concentrations were not
obtained, nor other biomarkers or imaging diagnostic tools were used. The influence of the
placenta on biomarker levels was not examined by this study, and the sample size of the newborns
from mothers with preeclampsia is small compared to the HN group (21 vs 146). Anyhow, according
to the Clinical and Laboratory Standard Institute guidelines, it is reasonable to collect 20 samples of
well-selected subjects to verify the reference interval of a specific population [17].

18 19 *Clinical implications*

20 Newborns at birth with respiratory distress present an extra challenge to most physicians because
of a lack of a well-communicated history. Rapid evaluation is needed so that they can be referred
quickly to the correct physician (i.e., cardiologist or pulmonologist) to receive appropriate treatment.
If our results are reproduced, BNP concentrations could have a great future as a biomarker. In our
population, the upper limit of BNP expression in the HN is < 40 pg/mL, if this result is reproduced in
future studies, this value could be used to address the clinical suspicion about the etiology of the
acute respiratory distress shortening the time to diagnosis and undergo specialized treatment.

27 28 **Conclusion**

1 1 In healthy newborns, BNP concentration at birth was lower than previously reported in similar
2 populations. Neonates under stress conditions related to complications at birth showed a higher
3 expression of this biomarker, which elucidates a possible link between stress and the
4 corresponding cardiovascular response in this population.

5
6 **Acknowledgments:** Thanks to *Werfen IL, Mexico* for providing equipment and supplies, as well as
7 to the team of doctors and fellows of Gynecology and Obstetrics and Pediatrics of Programas
8 Multicéntricos de Residencias Médicas, Tecnológico de Monterrey. Special thanks to Dr Flores-
9 Tamez, for his support and giving us access to the facilities for the development of the study. To Dr
10 Kristopher J. Currie G for editorial assistance.

References

- 1 Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007;**50**:2357–68.
2 doi:10.1016/j.jacc.2007.09.021
- 3 Vijlbrief D. *Cardiac biomarkers in Neonatology*. Utrecht University 2015.
- 4 El-Khuffash A, Molloy EJ. Are B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal-pro-BNP useful
5 in neonates? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007;**92**:F320–4. doi:10.1136/adc.2006.106039
- 6 Yañez J, Rodriguez D, Treviño C, et al. Stress transient hypertrophic cardiomyopathy and B-
7 type natriuretic peptide role. *Pediatr Cardiol* 2013;**34**:702–6. doi:10.1007/s00246-012-0317-5
- 8 Koch A, Singer H. Normal values of B type natriuretic peptide in infants, children, and
9 adolescents. *Heart Br Card Soc* 2003;**89**:875–8.
- 10 Ten Kate CA, Tibboel D, Kraemer US. B-type natriuretic peptide as a parameter for pulmonary
11 hypertension in children. A systematic review. *Eur J Pediatr* 2015;**174**:1267–75.
12 doi:10.1007/s00431-015-2619-0
- 13 Law YM, Hoyer AW, Reller MD, et al. Accuracy of plasma B-type natriuretic peptide to
14 diagnose significant cardiovascular disease in children: the Better Not Pout Children! Study. *J
15 Am Coll Cardiol* 2009;**54**:1467–75. doi:10.1016/j.jacc.2009.06.020
- 16 Smith J, Goetze JP, Andersen CB, et al. Practical application of natriuretic peptides in
17 paediatric cardiology. *Cardiol Young* 2010;**20**:353–63. doi:10.1017/S1047951110000211
- 18 Koch A, Zink S, Singer H. B-type natriuretic peptide in paediatric patients with congenital heart
19 disease. *Eur Heart J* 2006;**27**:861–6. doi:10.1093/eurheartj/ehi773
- 20 Nir A, Lindinger A, Rauh M, et al. NT-pro-B-type natriuretic peptide in infants and children:
21 reference values based on combined data from four studies. *Pediatr Cardiol* 2009;**30**:3–8.
22 doi:10.1007/s00246-008-9258-4
- 23 Backes CH, Markham K, Moorehead P, et al. Maternal Preeclampsia and Neonatal Outcomes.
24 *J Pregnancy* 2011;**2011**:1–7. doi:10.1155/2011/214365
- 25 Resnik JL, Hong C, Resnik R, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide (BNP) levels in
26 normal and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* 2005;**193**:450–4.
27 doi:10.1016/j.ajog.2004.12.006
- 28 Hakim J, Senterman MK, Hakim AM. Preeclampsia Is a Biomarker for Vascular Disease in Both
29 Mother and Child: The Need for a Medical Alert System. *Int J Pediatr* 2013;**2013**:1–8.
30 doi:10.1155/2013/953150
- 31 Inverness Medical. Triage BNP product insert. 2009. <http://www.alere.com/en/home/product-details/triage-bnp-test.html>
- 32 Chaiworapongsa T, Chaemsathong P, Yeo L, et al. Pre-eclampsia part 1: current
33 understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* 2014;**10**:466–80.
34 doi:10.1038/nrneph.2014.102
- 35 Determining Laboratory Reference Intervals: CLSI Guideline Makes the Task Manageable. *Lab
36 Med* 2009;**40**:75–6. doi:10.1309/LMEHV3HP39QOFJPA

- 1
2
3 17 Horowitz GL, Clinical and Laboratory Standards Institute. *Defining, establishing, and verifying*
4 2 *reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*. 2010.
5
6 18 Katayev A, Balciza C, Seccombe DW. Establishing reference intervals for clinical laboratory
7 4 test results: is there a better way? *Am J Clin Pathol* 2010;133:180–6.
8 5 doi:10.1309/AJCPN5BMTSF1CDYP
9
10 6 Bernus A, Wagner BD, Accurso F, et al. Brain Natriuretic Peptide Levels in Managing Pediatric
11 7 Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 2009;135:745–51. doi:10.1378/chest.08-
12 8 0187
13
14 9 Black PH, Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*
15 10 2002;52:1–23.
16
17 11 Jerjes-Sanchez C, Garcia N, Leon-Gonzalez ED de, et al. Significance of Biomarker Panel
18 12 Including Cardiac Troponin I, D-dimer, and B-Type Natriuretic Peptide in Acute Aortic
19 13 Dissection. *J Cardiol Ther* Published Online First: 2013. doi:10.12970/2311-052X.2013.01.02.4
20
21 14 Gemelli M, Mamì C, Manganaro R, et al. Effects of the mode of delivery on ANP and renin-
22 15 aldosterone system in the fetus and the neonate. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*
23 16 1992;43:181–4.
24
25 17 Seong WJ, Yoon DH, Chong GO, et al. Umbilical cord blood amino-terminal pro-brain
26 18 natriuretic peptide levels according to the mode of delivery. *Arch Gynecol Obstet*
27 19 2010;281:907–12. doi:10.1007/s00404-009-1253-3
28
29 20 Fortunato G, Carandente Giarrusso P, Martinelli P, et al. Cardiac troponin T and amino-terminal
30 21 pro-natriuretic peptide concentrations in fetuses in the second trimester and in healthy
31 22 neonates. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:834–6. doi:10.1515/CCLM.2006.144
32
33 23 Mulay S, Varma DR. Placental barrier to atrial natriuretic peptide in rats. *Can J Physiol
34 24 Pharmacol* 1989;67:1–4.
35
36 25 Bakker J. Reference Values for N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Umbilical Cord
37 26 Blood. *Clin Chem* 2004;50:2465–2465. doi:10.1373/clinchem.2004.040253
38
39 27 Zhu R, Nie Z. A Clinical Study of the N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide in Myocardial
40 28 Injury after Neonatal Asphyxia. *Pediatr Neonatol* 2016;57:133–9.
41 29 doi:10.1016/j.pedneo.2015.08.001
42
43 30 Omar HR. Acute cardiogenic pulmonary edema with normal BNP: the value of repeat BNP
44 31 testing. *Am J Emerg Med* 2015;33:605.e5-605.e6. doi:10.1016/j.ajem.2014.10.006
45
46 32 Mir TS, Laux R, Hellwege HH, et al. Plasma concentrations of aminoterminal pro atrial
47 33 natriuretic peptide and aminoterminal pro brain natriuretic peptide in healthy neonates: marked
48 34 and rapid increase after birth. *Pediatrics* 2003;112:896–9.
49
50 35 Mannarino S, Garofoli F, Mongini E, et al. BNP concentrations and cardiovascular adaptation in
51 36 preterm and fullterm newborn infants. *Early Hum Dev* 2010;86:295–8.
52 37 doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.04.003
53
54 38 Blohm ME, Arndt F, Sandig J, et al. Cardiovascular biomarkers in paired maternal and umbilical
55 39 cord blood samples at term and near term delivery. *Early Hum Dev* 2016;94:7–12.
56 40 doi:10.1016/j.earlhumdev.2016.01.001
57
58
59
60

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For peer review only

1
2
3 1 **Tables**
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For peer review only

Table 1. Demographic and clinical characteristics of healthy and preeclamptic mothers and newborns.

Characteristics	Healthy group, n=146 Median [Q1-Q3], No. (%)	Preeclamptic group, n=21 Median [Q1-Q3], No. (%)	p-Value
Mothers			
Age (years)	23.5 [18 – 29]	21 [18 – 28]	0.48
Public sector	118 (80.8)	21 (100)	< 0.0001
Gravidity 1	70 (47.9)	12 (57)	< 0.0001
Gravidity >1	76 (52)	9 (43)	< 0.0001
Abortion 1	19 (13)	2 (9)	> 0.9
Abortion >1	4 (2.7)	1 (4.8)	0.0009
Gestational age (weeks)	39.5 [38.5 – 40.2]	38.4 [37.2 – 40.2]	0.0153
Spontaneous labor	76 (52)	14 (66.7)	< 0.0001
Induced labor	70 (48)	7 (33.3)	< 0.0001
Spontaneous ruptures of membranes	87 (59.6)	17 (81)	< 0.0001
Artificial rupture of membranes	59 (40.4)	4 (19)	< 0.0001
Epidural analgesia	141 (96.6)	20 (95.2)	< 0.0001
Normal delivery	79 (54.1)	3 (14.3)	< 0.0001
Cesarean section	67 (45.9)	18 (85.7)	< 0.0001
Newborns			
Male	79 (54.1)	6 (28.6)	< 0.0001
Apgar score at 0 minutes	8 [8 – 9]	8 [8 – 8]	0.0002
Apgar score at 5 minutes	9 [9 – 9]	9 [9 – 9]	0.0001
Weight (kg)	3.3 [3.0 – 3.5]	3 [2.7 – 3.3]	0.0026
Estimated gestational age by Dubowitz score (weeks)	39.2 [38.4 – 40.1]	38.3 [37 – 39.6]	0.0032

1
2 **Table 2 Differences in BNP concentrations (Mann-Whitney U test)**
3
4

Complicated delivery	23 (15.8)	7 (33.3)	0.14
Cyanosis	0	5 (23.8)	0.00001526
Respiratory distress	0	3 (14.2)	0.000003815
Nursery	146 (100)	18 (85.7)	<0.00000001
Neonatal intensive care unit	0	3 (14.2)	0.000003815

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

	Healthy newborns		Preeclampsia-associated newborns	
	BNP Median (Q1-Q3)	p-value	BNP Median (Q1-Q3)	p-value
Overall BNP	12.1 (7.7-16.8)	-	20.8 (5.8-46.4)	0.037
Sex				
Male	12.0 (7.5-16.9)	0.91	11.15 (5.0-49.5)	0.51
Female	12.2 (8.4-16.0)		22.3 (9.9-45.1)	
Delivery				
Spontaneous	11.8 (7.7-16.0)	0.56	21.5 (11.6-36.4)	0.74
Induced labor	12.5 (8.3-17.4)		6.3 (5.0-57.6)	
Analgesia				
Epidural analgesia	11.8 (7.7-16.6)	0.08	18.4 (5.5-41.9)	0.38
Non-analgesia	14.3 (12.7-27.7)		54.5 (54.5-54.5)	
Delivery method				
Vaginal delivery	11.2 (6.8-15.3)	0.01	32.6 (15.1-32.6)	0.41
C-section	13.8 (8.9-18.1)		18.4 (5.2-45.7)	
Membrane rupture				
Spontaneous	11.7 (7.2-15.8)	0.05	20.8 (8.1-38.8)	1
Artificial rupture of membranes	13.8 (8.7-19.2)		31.3 (5.0-61.3)	
Complications				
Delivery complications	8.9 (6.7-13.7)	0.11	47.9 (12.2-62.6)	
Normal delivery	12.3 (8.3-16.8)		15.5 (5.0-25.4)	0.038

1

2

1
2 1 **Figure captions**

- 3 2 • **Figure 1.** Flow diagram of study and BNP values.
4 3 • **Figure 2.** Shows the distribution of the BNP values in HN group. The right-skewed
5 4 distribution was related to the limit of quantification of the equipment (5 pg/mL). Thus, a
6 5 logarithmic transformation was performed. However, the distribution remains right-side
7 6 skewed. Consequently, the reference interval was estimated using the rank-based method
8 7 for non-parametric distribution.
9 8 • **Figure 3.** Box plot of reference interval of BNP values in HN and PAN group (whiskers
10 9 represent 2.5th and 97.5th percentiles).

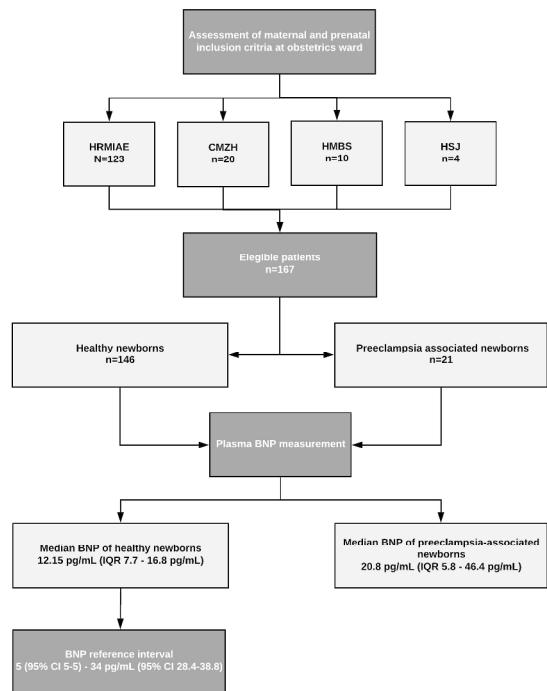
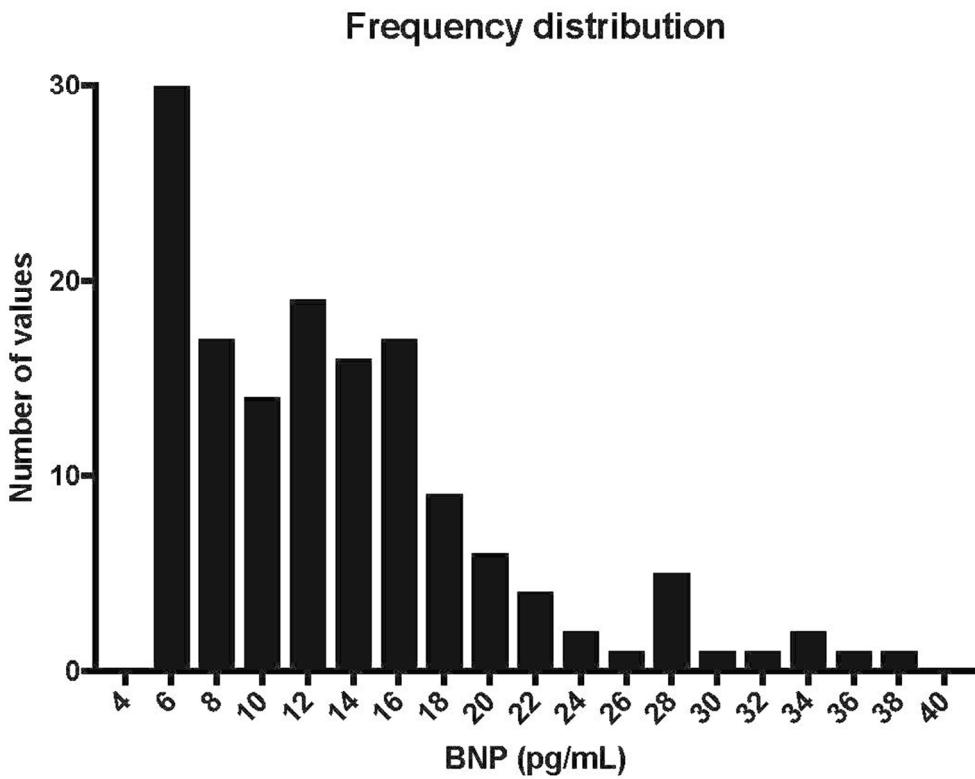


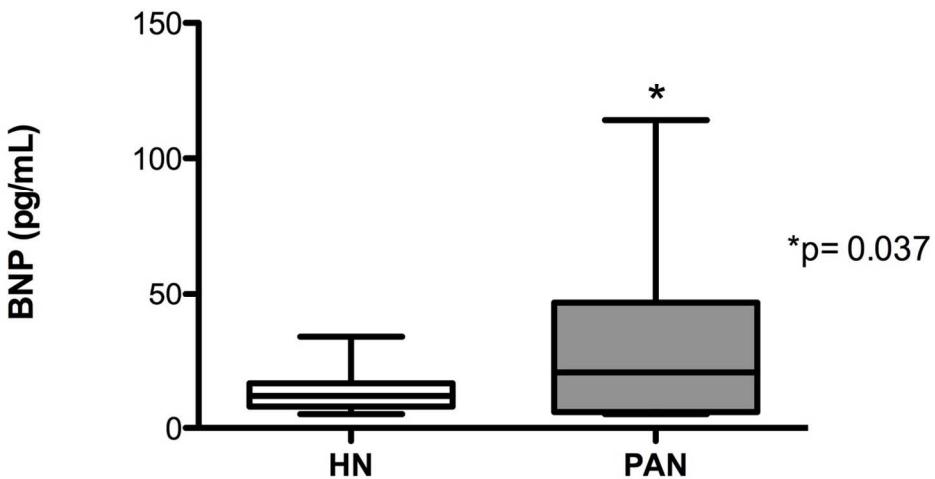
Figure 1. Flow diagram of study and BNP values

279x215mm (300 x 300 DPI)



- Figure 2. Shows the distribution of the BNP values in HN group. The right-skewed distribution was related to the limit of quantification of the equipment (5 pg/mL). Thus, a logarithmic transformation was performed. However, the distribution remains right-side skewed. Consequently, the reference interval was estimated using the rank-based method for non-parametric distribution.

91x72mm (300 x 300 DPI)



• Figure 3. Box plot of reference interval of BNP values in HN and PAN group (whiskers represent 2.5th and 97.5th percentiles).

125x66mm (300 x 300 DPI)

Protocolo EBNPRNS01

“Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”.

Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Departamento de Cardiología Pediátrica.
Instituto de Cardiología y Medicina Vascular
Centro Médico Zambrano Hellion- Tec Salud
Email: jmysanchez@itesm.mx

Tabla de contenidos

Síntesis	5
Planteamiento del problema	7
Antecedentes	8
Justificación	8
Objetivo	8
Diseño de estudio	9
Metodología del estudio.....	10
<i>Materiales</i>	10
<i>Lugar donde se realizará el estudio</i>	10
<i>Universo, muestra y tamaño de la muestra</i>	10
<i>Método de selección de pacientes</i>	11
<i>Criterios de inclusión, exclusión y suspensión de los participantes.</i>	11
<i>Análisis de observaciones</i>	11
<i>Técnicas, procedimientos y métodos de confiabilidad</i>	12
<i>Diseño general del estudio</i>	13
<i>Calendarización del estudio</i>	13
<i>Manejo de datos</i>	14
Aspectos éticos.....	14
<i>Clasificación de la investigación</i>	14
<i>Revisión por comité de ética</i>	14
<i>Información y Consentimiento</i>	15
<i>Riesgos previsibles y probables</i>	15
<i>Eventos Adversos</i>	15
<i>Protección frente al riesgo físico y/o emocional</i>	15
<i>Confidencialidad (Archivo Confidencial de la investigación)</i>	15
Diseminación de Datos y Publicación	16
Organización.....	16
<i>Recursos humanos</i>	16
<i>Recursos materiales</i>	17
<i>Capacitación del personal</i>	17
Financiamiento	17
<i>Origen del material</i>	17
Bibliografía	18
Anexos	19
<i>Formato de historia clínica EBNPRNS01</i>	19
<i>Formato resultado PNC EBNPRNS01</i>	20
<i>Consentimiento informado para los padres</i>	21

Datos de identificación

Protocolo: EBNPRNS01.

Titulado: "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano".

Investigador Principal.

Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Cardiólogo Pediatra. Instituto de Cardiología y Medicina Vascular. Centro Médico Zambrano Hellion – Tec Salud.

Batallón de San Patricio 112. Col. Real San Agustín. San Pedro Garza García, N.L. México.

Tel: 88880000

Co – investigador.

Dr. Héctor David Rodríguez Flores.

Médico Pasante en Servicio Social del Tecnológico de Monterrey.

Co- investigador.

Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz.

Cardiólogo FCCP. FACC. Instituto de Cardiología y Medicina Vascular. Centro Médico Zambrano Hellion – Tec Salud.

Departamentos participantes.

Cardiología Pediátrica del Instituto de Cardiología y Medicina Vascular.

Instituciones participantes.

Hospital San José – Tec Salud.

Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad – SSANL.

Hospital Metropolitano "Bernardo Sepúlveda" – SSANL.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

For peer review only. <http://bmjopen.bmjjournals.org/site/about/guidelines.xhtml>

1
2
3 Área de investigación.
4
5 Cardiología pediátrica, biomarcadores, recién nacido.
6
7
8 Línea de investigación.
9
10 Biomarcadores en recién nacido.
11
12
13 ¿En qué rama se realizará el estudio?
14
15 Cardiología pediátrica y biomarcadores.
16
17
18 Fecha probable de inicio y terminación del estudio.
19
20 Febrero de 2014 al 30 de Junio del 2014.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez. 4
For peer review only <http://bmjopen.bmjjournals.com/site/about/guidelines.xhtml>

Síntesis

Título	Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano.
Lugar de investigación	<ul style="list-style-type: none"> Hospital San José – Tec Salud. Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad – SSANL. Hospital Metropolitano “Bernardo Sepúlveda” – SSANL.
Investigadores	<p>Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.</p> <p>Dr. Héctor David Rodríguez Flores.</p> <p>Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz.</p>
Patrocinador	Instituto de Cardiología y Medicina Vascular – Centro Médico Zambrano Hellion.
Estudio clínico número	EBNPRNS01.
Aprobación del Comité de Ética	Aprobado.
Objetivos	Definir, establecer y verificar los valores del PNC del recién nacido en un sector de la población mexicana del estado de Nuevo León. Con la finalidad de determinar la utilidad clínica de este biomarcador en el paciente neonatal.
Diseño del estudio	<p>Clasificación del estudio: Original.</p> <p>Tipo de investigación: Observacional</p> <p>Características del estudio: Transversal.</p> <p>Tipo de análisis: Descriptivo.</p> <p>En relación al tiempo: Prospectivo.</p>

Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

For peer review only. <http://bmjopen.bmjjournals.org/site/about/guidelines.xhtml>

Sujetos	<p>Inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hijos e hijas de madres aparentemente sanas de entre 15 y 36 años de edad sin diabetes ni patologías asociadas al embarazo. • Control prenatal adecuado: 5 consultas mínimo (OMS). • Edad gestacional a término: (38-42 sdg). <p>Exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hijos e hijas de madre con patología previamente conocida. • Hijos e hijas con cromosomopatía detectada durante el control prenatal. <p>Suspensión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Detección durante el estudio de alguno de los criterios de exclusión. • Decisión de los padres de abandonar el estudio.
Mediciones	Medición del PNC extraído del cordón umbilical en el minuto 0 (cero) del nacimiento.
Muestra	Tamaño de la muestra: 146.
Análisis de observaciones	Método no paramétrico de estimación. Prueba de Dixon para el análisis de las observaciones atípicas.

Planteamiento del problema

Los biomarcadores cardiacos son capaces de darnos información relevante sobre la estructura y función del miocardio y pueden ayudarnos a identificar enfermedades y su repercusión a nivel celular en el recién nacido a término¹. Entre los biomarcadores más utilizados se encuentran: los péptidos natriuréticos y troponinas. Los primeros están relacionados con el estrés cardiaco y tensión ventricular, mientras que las últimas están relacionadas con daño agudo del miocito.

La determinación de péptido natriurético cerebral (PNC) es utilizada como herramienta para el diagnóstico y pronóstico en el adulto con insuficiencia cardiaca derecha o izquierda con o sin función sistólica preservada, cardiomielitis hipertrófica, remodelación ventricular post infarto y displasia arritmogénica del ventrículo derecho.

Después del nacimiento, el ventrículo derecho del neonato se expone a una mayor presión pulmonar, por lo tanto, los niveles elevados del PNC estimulan la vasodilatación y la diuresis, desempeñando un papel fundamental en la adaptación hemodinámica después del nacimiento. La disminución de la presión pulmonar, debido a la expansión pulmonar, y el inicio de la diuresis con la maduración renal explican la subsecuente disminución de los valores del PNC. Sin embargo, el incremento en el uso de este biomarcador en la práctica clínica en nuestro medio justifica conocer valores de referencia , y estandarizar el método de medición. Lo cual haría posible su utilización con fines clínicos en el paciente neonatal con lo que podría mejorarse la calidad de la atención.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez. 7

Antecedentes

Los valores normales del PNC en pediatría cada vez se definen más, tanto en cardiopatías congénitas como en adquiridas. Koch y cols., reportaron la variabilidad que tienen en la etapa neonatal⁴. Law y cols sugieren en neonatos como cifras normales 170 pg/ml y para niños mayores a esta edad 41 pg /ml; este corte tiene sensibilidad de 94% y especificidad de 87%².

Justificación

La medición del PNC adquiere gran relevancia, ya que puede ayudar en la práctica clínica a establecer la diferencia entre enfermedades pulmonares, infecciosas o metabólicas de aquellos con insuficiencia cardíaca izquierda con o sin función sistólica preservada de diversa etiología⁵, e iniciar un abordaje terapéutico temprano y específico que repercute de en el pronóstico del paciente.

Sin embargo, ningún estudio ha podido estandarizar los valores de corte normales para el neonato sano. Es por esto que se propone estandarizar el PNC en el paciente neonatal en nuestro medio.

Objetivo

Definir, establecer y verificar los valores del PNC del recién nacido en un sector de la población mexicana del estado de Nuevo León. Con la finalidad de determinar la utilidad clínica de este biomarcador en el paciente neonatal.

Diseño de estudio

Clasificación del estudio: Original.

Tipo de investigación: Observacional

Características del estudio: Transversal.

Tipo de análisis: Descriptivo.

En relación al tiempo: Prospectivo.

Metodología del estudio

Población: Recién nacidos sanos de madres entre los 15 y 36 años de edad, sin patología conocida previamente ni asociada al embarazo que cumplan con los criterios de inclusión.

Materiales

Kit de extracción de sangre: Lavander top. Invert 8 – 10x. Spray – dried potassium EDTA.
Hielera con geles de congelación para preservar las muestras a 4°C.
RayBio® sandwich ELISA kit ELH-BNP-001. RayBiotech Inc.
Lector Multi-modal de Microplacas Synergy HT™– BioTek Instruments™. Centrífuga Allegra 25R® – Beckman Coulter Inc.

Lugar donde se realizará el estudio

El estudio está proyectado a realizarse en los hospitales e instituciones de salud pertenecientes al programa de residencias médicas del Sistema Tec Salud: Hospital San José-Tec de Monterrey (Tec Salud), Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad (SSANL) y Hospital Metropolitano “Bernardo Sepúlveda”(SSANL).

Universo, muestra y tamaño de la muestra

Universo: Recién nacidos sanos de madres entre los 15 y 36 años de edad, sin patología conocida previamente ni asociada al embarazo que cumplan con los criterios de inclusión.

Muestra: Única y obtenida del cordón umbilical en el minuto 0 (cero) posterior al parto o cesárea.

Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2
3 **Tamaño de la muestra:** 146 pacientes que cumplan con los criterios de inclusión
4 establecidos para este proyecto⁶.
5
6
7
8

9 **Método de selección de pacientes**

10 Se seleccionarán a los recién nacidos sanos de madres entre los 15 y 36 años de
11 edad, sin patología conocida previamente ni asociada al embarazo que cumplan con
12 los criterios de inclusión.
13
14

15 Por consentimiento informado: el estudio se realizará sólo en los recién nacidos que
16 cuenten con un consentimiento informado debidamente llenado y firmado por los
17 padres o tutores (se anexan formatos).
18
19
20
21
22
23
24

25 **Criterios de inclusión, exclusión y suspensión de los participantes.**

26 **Inclusión:** Recién nacidos sanos de madres aparentemente sanas de entre 15 y 36
27 años de edad sin diabetes ni patologías asociadas al embarazo con control prenatal
28 adecuado de 5 consultas y edad gestacional a término: (38-42 sdg).
29
30

31 **Exclusión:** Recién nacidos de madres con patología previamente conocida y recién
32 nacidos con cromosomopatía detectada durante el control prenatal.
33
34

35 **Suspensión:** Detección durante el estudio de alguno de los criterios de exclusión o si
36 los padres deciden no participar más en el protocolo.
37
38
39

40 **Análisis de observaciones.**

41 El método de análisis que se utilizará para la determinación del intervalo de
42 referencia será el método no paramétrico de estimación, ya que no hace ninguna
43 suposición específica acerca de la distribución de probabilidad de los valores de
44 referencia observados. La evaluación de las observaciones atípicas será mediante la
45 prueba de Dixon⁶.
46
47
48
49
50

51
52
53
54
55
56
57 **Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”.** Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
58 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
59
60

1
2
3 **Técnicas, procedimientos y métodos de confiabilidad**
4
5

6 **Método para Determinar los niveles séricos o tisulares del péptido natriurético
7 cerebral (PNC, por sus siglas en inglés).**
8
9

10 El método para la determinación de los niveles séricos de PNC está basado en la
11 inmunodetección. Para la realización de este proyecto utilizaremos el método de
12 inmunodetección en placa conocido como ELISA.
13
14

15 **ELISA**
16

17 **Fundamento:** el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas o ELISA por sus
18 siglas en inglés (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es una técnica de
19 inmunoensayo en la cual un anticuerpo unido a una enzima se utiliza para detectar
20 los niveles del antígeno en cuestión. La técnica de ELISA tipo sándwich consiste en
21 colocar un anticuerpo para nuestro antígeno (proteína de interés), un segundo
22 anticuerpo conocido como anticuerpo anti-antígeno marcado (unido a una enzima,
23 peroxisada) y un sustrato que utilizará dicha enzima, para provocar un cambio en la
24 coloración, misma que será medida a través de espectrofotometría indicando por
25 consiguiente, de una manera indirecta, la cantidad de antígeno presente.
26
27

28 **Técnica:** En una placa de 96 pozos, se coloca el anticuerpo dirigido para la captura de
29 PNC (anti-PNC, sc-391192), se deja 16 hrs a temperatura de 4°C, con la finalidad de
30 absorber el anticuerpo a la placa. Posteriormente la placa se lava con buffer de PBS
31 pH 7.2 +/-0.2 y se bloquean los sitios libres de la placa con BSA al 1% en PBS-T
32 (0.05%) durante una hora, con la finalidad de evitar la adherencia inespecífica del
33 antígeno. Posteriormente se coloca la muestra de interés para capturar el PNC
34 presente. Se deja incubar por un período de dos horas. Finalmente se coloca el
35 anticuerpo secundario y se revela con avidina conjugada con peroxidasa por 30
36 minutos utilizando como sustrato ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-
37 sulfonic acid, sc-251817). La absorbencia se mide a 405 y 650 nm. Las
38 concentraciones de proteína se obtienen utilizando como estándar PNC comercial
39 (B7313 SIGMA).
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55
56
57 **Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”.** Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
58 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
59
60

Diseño general del estudio

De inicio a término, este proyecto está contemplado para una duración de 5 meses, dividiéndose en tres fases:

1. Primera fase, con duración de tres meses para la recolección y procesamiento de muestra y almacenamiento de datos.
2. Segunda fase, con duración de tres meses para el análisis estadístico de los datos recolectados mediante la creación de base de datos.
3. Tercera fase, con duración de dos meses para el análisis de resultados y la creación del reporte final en búsqueda de su publicación para su difusión dentro de la comunidad científica.

Tras la recolección y refrigeración de las muestras, deberán ser transportadas al laboratorio (ICMV) para su procesamiento.

Para el almacenamiento y análisis de datos se creará una base de datos que reúna las variables significativas del paciente con la finalidad de permitir un estudio estadístico eficiente. Además de mantenerse apagado a los lineamientos de confidencialidad y privacidad del paciente.

Calendarización del estudio

	2014				
	F	M	A	M	J
Recolección de muestra y datos	1	1	1		
Análisis estadístico		2	2	2	
Reporte de resultados			3	3	

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

- **Fase 1:** Febrero 2014- Abril 2014:
 - Recolección de muestra y almacenamiento de datos obtenidos tras el procesamiento en laboratorio.
- **Fase 2:** Marzo 2014 – Mayo 2014:
 - Creación de base de datos para análisis estadístico.
 - Análisis de resultados.
- **Fase 3:** Mayo 2014 – Junio 2014:
 - Elaboración de reporte final.
 - Difusión dentro de la comunidad científica.

Manejo de datos

Solamente los investigadores tendrán acceso a los datos recopilados durante el estudio.

La recolección de muestras sanguíneas será realizada por el co-investigador. La recopilación final de datos será realizada por el investigador principal. La identidad de los sujetos en cuestión será manejada como confidencial en todo momento y se les otorgara un número que servirá como identificación. Ninguna persona ajena a la investigación podrá alterar, utilizar o divulgar la información recolectada

Aspectos éticos

Clasificación de la investigación

Según el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Artículo N° 17: Investigación con riesgo mínimo.

Revisión por comité de ética

Los investigadores se comprometen a someter el presente protocolo así como consentimiento informado al comité de ética. En caso de cambios en el protocolo el equipo de investigación se compromete a informar al comité de ética, lo mismo aplica en caso de presentarse alguna eventualidad durante el desarrollo del mismo.

Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1 2 **3 Información y Consentimiento**

3
4 Como requisito fundamental para formar parte del estudio, los padres del recién
5 nacido deben leer y firmar un consentimiento informado.
6

7 El documento en cuestión se encuentra redactado en terminología simple para
8 facilitar la comprensión del personal no médico. Se leerá y firmará durante el primer
9 contacto del investigador con los padres del recién nacido, previo a la recolección de
10 la muestra, en el cual los padres podrán externar sus comentarios y dudas respecto
11 al estudio.
12
13

14 15 16 17 18 **19 Riesgos previsibles y probables**

20 Debido a que el estudio está enfocado en la recolección de sangre del cordón
21 umbilical, se considera el riesgo de punción del personal encargado de la toma de la
22 muestra.
23
24

25 26 27 **28 Eventos Adversos**

29 Se definirá como evento adverso a cualquier situación o eventualidad que ponga en
30 riesgo el bienestar físico, emocional o social del participante en el estudio. En caso
31 de que se presenten eventos adversos el investigador principal se compromete a dar
32 aviso al comité de ética para buscar una recomendación.
33
34

35 36 37 **38 Protección frente al riesgo físico y/o emocional**

39 Toda la información recabada se manejará con absoluta discreción; tratándose como
40 información confidencial, de acuerdo a las reglas éticas de la institución
41 correspondiente.
42
43

44 45 46 **47 Confidencialidad (Archivo Confidencial de la investigación)**

48 En el manejo y archivo de los datos de los sujetos que participen en esta
49 investigación seguiremos lo indicado por la Ley Federal de Protección de Datos
50 Personales en Posesión de los Particulares del siguiente modo:
51
52

53 Toda la información de los pacientes asignados al protocolo será resguardada en el
54 expediente clínico de este, se les identificará con un número, el cual conocerán los
55 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 15
56 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
57 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
58
59
60

padres y sólo los investigadores tendrán acceso a éstos. Se protegerán los datos personales de los pacientes, de manera tal que sólo se utilizará el número asignado al paciente para identificación de muestras, estudios y no serán utilizados éstos para ningún otro protocolo o investigación.

No existirá remuneración económica por participar en este estudio. Queda bajo la responsabilidad de los médicos tratantes el cuidado y manejo de los recién nacidos que participen en el estudio.

Diseminación de Datos y Publicación

Al contar con los resultados del estudio, se presentarán dentro de la comunidad científica en alguna de las revistas indexadas en las áreas de pediatría y cardiología. Como autores aparecerán el Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez (investigador principal), Dr. Héctor David Rodríguez Flores (co-investigador) y el Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz (co-investigador).

Organización

Recursos humanos

Nombre del personal	Cargo	Funciones del personal	Tiempo de actividad
Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez	Cardiólogo pediatra ICMV - CMZH	Análisis de resultados, firma del consentimiento informado. Explicación de pormenores del estudio.	3 años
Dr. Héctor David	Médico Pasante en	Recolección de	3 años

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

	Rodríguez Flores	Servicio Social del Tec de Monterrey	muestras, análisis de resultados, firma del consentimiento informado. Explicación de pormenores del estudio.	
	Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz	Director de Investigación Clínica del ICMV - CMZH	Asesoramiento en la investigación.	3 años

Recursos materiales

Materiales

- Kit de extracción de sangre: Lavander top. Invert 8 – 10x. Spray – dried potassium EDTA.
- Gradilla para colocación de tubos de muestras.
- Hielera.
- Geles de congelación.
- RayBio® sandwich ELISA kit ELH-BNP-001. RayBiotech Inc.

Aparatos

- Lector Multi-modal de Microplacas Synergy HT™ - **BioTek Instruments™**.
- Centrifuga Allegra 25R™ **Beckman Coulter Inc.**

Capacitación del personal

El Dr. Héctor David Rodríguez Flores cuenta con la capacitación requerida para la recolección y procesamiento de las muestras de sangre del cordón umbilical.

Financiamiento

Origen del material

Los recursos a utilizar son otorgados por la Cátedra de Cardiología del Instituto de Cardiología y Medicina Vascular del Centro Médico Zambrano Hellion. Participar en el estudio no genera ningún costo al paciente.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Bibliografía

- 1 1.- Vijlbrief, D. B. (2012). Use of biomarkers in neonatology. *Pediatric Research*, 337-
2 343.
- 3 2.- Law YM, Hoyer AW, Reller MD, Silberbach M (2009). Accuracy of plasma B-type
4 natriuretic peptide to diagnose significant cardiovascular disease in children. *J Am
5 Coll Carol* 54:1467-1475.
- 6 3.- Smith, J. Goetze, JP, Andersen CB, Vejlstrup N (2010). Practical application of
7 natriuretic peptides in paediatric cardiology. *Carol Young* 20:352-363.
- 8 4.- Koch, A. Zink, S. Singer, H. (2006) B-type natriuretic peptide in paediatric patients
9 with congenital heart disease. *European Heart Journal* 27: 861-866.
- 10 5.- Yáñez, J. Rodriguez, D. Treviño, C. Valdez, A. Sánchez, CJ. (2013). Stress Transient
11 Hypertrophic Cardiomyopathy and B-Type Natriuretic Peptide Role. *Pediatric
12 Cardiology* 34:702-706. Springer.
- 13 6.- CLSI. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical
14 Laboratory; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI document EP28-A3c. Wayne,
15 PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
- 16 7.- Katayev Alex, C. B. (2010). Establishing Reference Intervals for Clinical Laboratory
17 Test Results. Is There a Better Way? *Clinical Chemistry* .
- 18 8.- Lab Medicine. (2009). Determining Laboratory Reference Intervals: CLSI Guideline
19 Makes the Task Manageable. *ASCP Lab Medicine* , 40 (2), 75-76.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

For peer review only <http://bmjopen.bmjjournals.org/site/about/guidelines.xhtml>

1
2
3
4
5
6
Anexos

7
8
9
10 **Formato de historia clínica EBNPRNS01**

11
12 **Historia clínica del recién nacido. EBNPRNS01**

13 Fecha: Número participante:

14 Nombre de la madre:

15 Nombre del padre:

16 **Madre**

17 Edad: Tipo de sangre: G ___ P ___ C ___ A ___ VDRL/RPR

18 Comorbilidades:

19 **Embarazo**

20 Lugar y número de consultas del control prenatal:

21 Complicaciones durante el embarazo:

22 Medicamentos utilizados durante el embarazo:

23 **Labor y parto**

24 Trabajo de parto espontáneo o inducido:

25 Complicaciones del trabajo de parto:

26 Monitoreo fetal:

27 Ruptura de membranas: espontáneo o artificial.

28 Tiempo previo al parto:

Características:

29 Medicamentos, incluidos analgesia y anestesia.

30 Tiempo previo a parto.

31 Duración de fases de trabajo de parto.

32 Vaginal o cesárea.

33 APGAR 0/5.

34 Maniobras de resucitación.

35 **Recién nacido**

36 Peso al nacer: Edad gestacional:

37 Crecimiento intrauterino: Género:

38 Fecha y hora del nacimiento:

39 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
40 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2 Signos vitales.
3
4

- 5 • Temperatura:
- 6 • Frecuencia cardiaca:
- 7 • Frecuencia respiratoria:
- 8 • Glucosa capilar:
- 9 • Problemas: Cianosis, dificultad respiratoria.

10
11 Edad gestacional estimada por Ballard.
12
13

- 14 • Física:
15 • Neuromuscular:
16
-

24 Nombre y firma de quien elaboró cuestionario
25

30 Formato resultado PNC EBNPRNS01
31
32

33 Resultado de PNC. EBNPRNS01
34

37 Fecha:

38 Número de participante:

39 PNC (0):
40
41

42 Lugar de procesamiento de la muestra
43

1
2
3 **Consentimiento informado para los padres**
4
5

6 **CONSENTIMIENTO INFORMADO**
7

8 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”
9

10 **Nombre de los investigadores:**
11

12 Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
13 Dr. Héctor David Rodríguez Flores.
14 Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz.
15

16 **Dirección del sitio de investigación:**
17

18 Centro Médico Zambrano Hellion. Batallón de San Patricio No. 112, Colonia
19 Residencial San Agustín. CP 66278. San Pedro Garza García. N. L., México.
20

21 Número de teléfono durante el día: 88-88-05-00.
22

23 Número de teléfono 24 Horas: 8183668143 – 8117805441.
24

25 **Introducción**
26

27 A través de este documento queremos hacerle una invitación a participar
28 voluntariamente en un estudio de investigación clínica, el cual tiene como objetivo
29 principal:
30

31 Definir, establecer y verificar los valores del PNC del recién nacido en un sector de la
32 población mexicana del estado de Nuevo León. Con la finalidad de determinar la
33 utilidad clínica de este biomarcador en el paciente neonatal.
34

35 Antes de que usted acepte la participación de su hijo(a) en este estudio, se le
36 presenta este documento de nombre “Consentimiento Informado”, que tiene como
37 objetivo comunicarle de los posibles riesgos y beneficios para que usted pueda
38 tomar una decisión informada.
39

40 El consentimiento informado le proporciona información sobre el estudio al que se
41 le está invitando a participar, por ello es de suma importancia que lo lea
42 cuidadosamente antes de tomar alguna decisión y si usted lo desea, puede
43 comentarlo con quien desee (un amigo, un familiar de confianza, etc.) Si usted tiene
44 preguntas puede hacerlas directamente a su médico tratante o al personal del
45 estudio quienes le ayudarán a resolver cualquier inquietud.
46

47 Una vez que tenga conocimiento sobre el estudio y los procedimientos que se
48 llevarán a cabo, se le pedirá que firme este documento para poder participar en el
49 estudio. Su decisión es **voluntaria**, lo que significa que **usted es totalmente libre de**
50 **ingresar o no en el estudio.** Podrá retirar su consentimiento en cualquier momento
51 y sin tener que explicar las razones, sin que esto signifique una disminución en la
52 calidad de la atención médica que se le proveerá , ni deteriorará la relación con su
53 médico tratante.
54

55 Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en 21
56 el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
57 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
58

Propósito del Estudio

El uso de biomarcadores representan una herramienta en el abordaje clínico de diversas patologías. La determinación de PNC es utilizada como herramienta para el diagnóstico y pronóstico en el adulto. Sin embargo, en pediatría aún no se logran determinar los valores de referencia de este biomarcador, por lo tanto, aún no está bien definida la utilidad clínica del mismo.

Por lo tanto, este protocolo busca definir, establecer y verificar dichos valores mediante la toma de muestras de sangre del cordón umbilical.

¿Cuántos pacientes participaran en el estudio?

146 pacientes que cumplan con los criterios de inclusión.

¿Cuánto durará su participación?

Durante su estancia intrahospitalaria.

¿Qué sucederá durante el estudio de Investigación?

Después de firmar el consentimiento informado se verificará que su hijo(a) cumpla con los siguientes criterios de Inclusión:

- Hijos e hijas de madres aparentemente sanas de entre 15 y 36 años de edad sin diabetes ni patologías asociadas al embarazo.
- Control prenatal adecuado: 5 consultas mínimo (OMS).
- Edad gestacional a término: (38-42 sdg).

Y que no presente ningún criterio de exclusión:

- Hijos e hijas de madres con patología previamente conocida.
- Hijos e hijas con cromosomopatía detectada durante el control prenatal.

Los siguientes son criterios de suspensión del estudio:

- Detección durante el estudio de alguno de los criterios de exclusión.
- Decisión de los padres de abandonar el estudio.

Procedimientos del Estudio

La recolección de muestra se realizará al momento del nacimiento, mediante la toma de una muestra de sangre del cordón umbilical, previo a ser cortado, independientemente de la vía de nacimiento (parto o cesárea).

Todas las recolecciones se llevarán a cabo previo al ingreso al área de cuneros.

Responsabilidades del Paciente

Proporcionar información acerca de su salud durante el estudio, especialmente cualquier evento adverso/cambios benéficos y en relación a su embarazo.

Reportar todos los síntomas independientemente de que estén relacionados o no con el estudio.

Reportar cualquier medicamento agregado o cambios a sus medicamentos prescritos.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2 Seguir las instrucciones del investigador respecto al medicamento y procedimientos
3 del estudio
4
5
6
7
8
9

Riesgos

10 **No existen riesgos para la madre o el recién nacido ya que la toma de muestras se**
11 **realizará directamente del cordón umbilical.**

12 **Beneficios**

13 El presente estudio **no representa ningún beneficio clínico para el paciente o sus**
14 **familiares.** Sin embargo, su participación es indispensable para el desarrollo del
15 estudio de biomarcadores, los cuales serán de gran utilidad para las generaciones
16 futuras.
17
18

19 **¿Qué opciones están disponibles aparte de participar en este estudio?**

20 Ninguna.
21
22

23 **Compensación por lesiones**

24 No existe posibilidad alguna de sufrir alguna lesión ya que las muestras de sangre
25 serán obtenida del cordón umbilical del recién nacido.
26

27 De ninguna manera el firmar esta forma de consentimiento anula sus derechos
28 legales ni libera a los investigadores, patrocinador o instituciones participantes de su
29 responsabilidad legal y profesional.
30
31

32 **¿Participar en el estudio es voluntario?**

33 Sí. Participar en este estudio de investigación es su decisión. Usted puede decidir no
34 participar o cambiar de opinión y después retirarse (abandonar). No habrá ninguna
35 penalidad y usted no perderá ningún beneficio que reciba ahora o que tenga
36 derecho a recibir.
37
38

39 Le diremos si contamos con información que pueda hacerlo cambiar de opinión
40 acerca de su participación en este estudio de investigación. Si usted desea
41 abandonarlo, deberá comentarlo directamente con el equipo de investigación.
42 Nos aseguraremos de que usted pueda terminar el estudio de la manera más segura.
43 En caso de ser necesaria, usted recibirá la atención de seguimiento adecuada.
44

45 El equipo de investigadores o el patrocinador del estudio pueden decidir retirarlo del
46 estudio sin su consentimiento si:
47

- 48
- 49 • **Usted no sigue las instrucciones de forma correcta.**
 - 50 • **El equipo de investigadores decide que el estudio no es lo mejor para usted.**
 - 51 • **El estudio es interrumpido por el patrocinador del estudio, el Consejo de**
52 **Revisión Institucional (CRI) o el Comité de Ética Independiente (CEI); grupo**
53 **de profesionales en el área que revisan la investigación para proteger sus**
54 **derechos, o por una agencia regulatoria.**

55
56 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 23
57 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
58 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
59
60

1
2
Costo de la participación

3
4 **No habrá ningún costo por su participación en este estudio.** El material en estudio,
5 los procedimientos relacionados con el estudio y las visitas del estudio serán
6 proporcionados sin ningún costo para usted o su compañía de seguros.
7
8

9 Usted será responsable por el costo de su atención médica habitual, incluidos los
10 procedimientos y/o medicamentos no relacionados con el estudio que el equipo de
11 investigadores o su médico tratante requieran durante el estudio como parte de su
12 atención médica habitual.
13
14

15 **¿Me pagarán por participar en este estudio?**

16 **No recibirá ningún pago por participar en este estudio.**

17
18 **Si participo en este protocolo de investigación, ¿Cómo se protegerá mi privacidad?**

19 **Confidencialidad**

20 Con su consentimiento, su médico tratante será informado que usted decidió
21 participar en este estudio de investigación.
22
23

24 Sus registros obtenidos mientras usted participa en este estudio, así como los
25 registros de salud relacionados, permanecerán estrictamente confidenciales en todo
26 momento. Sin embargo, tendrán que estar disponibles para, los miembros del
27 Comité de Ética Independiente y las autoridades médicas regulatorias.
28
29

30 Al firmar este consentimiento, usted otorga permiso para el estudio actual y
31 cualquier investigación posterior que pueda llevarse a cabo utilizando esta
32 información. Sin embargo, el equipo de investigadores tomará las medidas
33 necesarias para proteger su información personal, y no incluirá su nombre en ningún
34 formato, publicaciones o divulgación futura. Si se retira del estudio, no obtendremos
35 más información personal acerca de usted, pero podremos continuar utilizando la
36 información ya recopilada.
37
38

39 **Usted no será identificado en ninguno de los reportes o publicaciones que resulten**
40 **de este estudio.**

41
42 **SUS DERECHOS NO SON AFECTADOS BAJO NINGUNA LEY DE PROTECCIÓN DE LA**
43 **INFORMACIÓN.**

44
45 **¿A quién podré contactar si tengo preguntas del estudio o acerca de mis derechos?**

46 Antes de que usted firme este documento, deberá preguntar acerca de cualquier
47 cosa que no haya entendido. El equipo de investigadores responderá sus preguntas
48 antes, durante y después del estudio. Si usted piensa que su pregunta no ha sido
49 contestada completamente o si no entiende la respuesta, por favor continúe
50 preguntando hasta que esté satisfecho.
51
52

53 Si tiene alguna preocupación o queja acerca de este estudio o sobre cómo se está
54 realizando, por favor no dude en discutir sus preocupaciones con los investigadores:
55
56

57 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 24
58 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
59 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
60

1
2
3 Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez
4 Dr. Héctor David Rodríguez Flores
5 Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz
6
7
8
9

10
11 No firme este formato a menos que usted haya tenido la oportunidad de hacer
12 preguntas y de que haya obtenido respuestas satisfactorias a todas sus preguntas.
13
14

15 Este Consentimiento ha sido revisado por las Comisiones de Ética e Investigación de
16 la Fundación Santos y de la Garza Evia I.B.P. (Hospital San José) y de la Escuela de
17 Medicina Tecnológico de Monterrey.
18
19

20 **Si usted tiene alguna pregunta con respecto a sus derechos como un paciente de**
21 **investigación, usted puede comunicarse al (01) 81 8888210.**
22
23

FIRMAS

24 Marcar con una X si se cumplió con lo que se menciona.
25
26

- 27 He sido informado acerca del estudio y tuve mi primer diálogo con el médico del
28 estudio o el personal de la investigación acerca de dicha información el (Fecha)
29 _____ a la hora (si es necesario) _____. (La hora es necesaria
30 solamente si la información y el consentimiento fueron entregados el mismo día.)
31 He leído y entendido la información en este documento de consentimiento
32 informado.
33 He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas fueron
34 contestadas a mi satisfacción.
35 Consiento voluntariamente la participación de mi hijo(a) en este estudio. No
36 renuncio a ninguno de mis derechos legales al firmar este documento de
37 consentimiento.
38
39

40 **Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de este documento, que tiene #**
41 **páginas.**
42
43

44 Nombre del familiar del participante:
45
46

47 Firma del familiar del participante:
48

49 Fecha de la firma:
50
51

52 **Nombre del representante legalmente autorizado:**
53 Parentesco:
54 Firma del representante:
55 Fecha de la firma:
56
57

58 **Testigos Imparciales**

59 Nombre del Testigo Imparcial 1:
60 Dirección del Testigo Imparcial 1:
61 Parentesco:
62 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 25
el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez
For peer review only. <http://bmjopen.bmjjournals.com/site/about/guidelines.xhtml>

1
2 Firma del Testigo Imparcial 1:
3 Fecha:
4
5
6
7
8

9 Nombre del Testigo Imparcial 2:
10 Dirección del Testigo Imparcial 2:
11 Parentesco:
12 Firma del Testigo Imparcial 2:
13 Fecha:
14
15
16

17 **Persona que Obtiene el Consentimiento**
18
19
20

21 Nombre de la persona que condujo el proceso del consentimiento:
22 Firma:
23 Fecha de la firma:
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 * †El investigador o una persona adecuadamente calificada y capacitada designada
35 por el equipo de investigadores para dirigir el proceso de consentimiento informado
36 debe firmar y fechar la forma al mismo tiempo que el sujeto.
37

38 ‡Testigo imparcial: Una persona que es independiente al estudio, que no puede ser
39 influida injustamente por las personas involucradas con el estudio, que está
40 presente en el proceso de consentimiento informado si el sujeto o el representante
41 legalmente aceptable del sujeto no puede leer y que lee el consentimiento
42 informado y cualquier otra información escrita proporcionada al sujeto.
43 Guía E6 de Buenas Prácticas Clínicas para la Industria: Guía consolidada.
44

1
2
3
4 **STROBE 2007 (v4) Statement—Checklist of items that should be included in reports of cohort studies**

Section/Topic	Item #	Recommendation	Reported on page #
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	2
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	2
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	4
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	4
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	4-5
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	4-5
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up	5
		(b) For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed	NA
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	5-6
Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	5-6
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	4-5
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	6
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	6
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	6
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	6
		(c) Explain how missing data were addressed	7
		(d) If applicable, explain how loss to follow-up was addressed	NA
		(e) Describe any sensitivity analyses	NA
Results			7

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram	7 5
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest (c) Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	7 NA
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures over time	5
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	7 7
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	8
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	9
Limitations			
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	12-13
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	13
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	3

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

BMJ Open

B-type natriuretic peptide reference interval of newborns from healthy and preeclamptic women: a prospective, multicenter, cross-sectional study

Journal:	<i>BMJ Open</i>
Manuscript ID	bmjopen-2018-022562.R2
Article Type:	Research
Date Submitted by the Author:	21-Jun-2018
Complete List of Authors:	Rodriguez, David; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Clinical Research; Instituto de Cardiologia y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Garcia-Rivas, Gerardo; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Laresgoiti-Servitje, Estibalitz; Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Ciencias Clinicas Yañez, Jesus; Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Torre-Amione, Guillermo; Instituto de Cardiologia y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Jerjes-Sanchez, Carlos; Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Clinical Research
Primary Subject Heading:	Paediatrics
Secondary Subject Heading:	Cardiovascular medicine
Keywords:	Biomarkers, BNP, reference interval, newborn, preeclampsia

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **B-type natriuretic peptide reference interval of newborns from healthy and preeclamptic**
4 **women: a prospective, multicenter, cross-sectional study**
5
6
7
8

9 David Rodriguez^{a,b}, Gerardo Garcia-Rivas^a, Estibalitz Laresgoiti-Servitje^c, Jesus Yañez^b, Guillermo
10 Torre-Amione^{a, b, d}, Carlos Jerjes-Sanchez^{a,b*}.
11
12
13

14 ^a*Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de*
15 *Medicina, Tecnologico de Monterrey, Mexico.*
16
17

18 ^b*Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la*
19 *Salud, Tecnologico de Monterrey, Mexico.*
20
21

22 ^c*Ciencias Médicas Clínicas, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de*
23 *Monterrey, Mexico.*
24
25

26 ^d*Methodist DeBakey Heart and Vascular Center, The Methodist Hospital, USA.*
27
28
29

30 **ORCID ID:**

- 31 • David Rodriguez: <https://orcid.org/0000-0002-0811-4235>
32 • Gerardo Garcia-Rivas: <https://orcid.org/0000-0003-4731-3293>
33 • Estibalitz Laresgoiti-Servitje: <https://orcid.org/0000-0002-3271-9955>
34 • Carlos Jerjes-Sanchez: <https://orcid.org/0000-0003-3222-7405>
35
36
37

38 ***Corresponding author:** Carlos Jerjes-Sanchez, Director of Clinical Research, Instituto de
39 Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud. Centro Medico Zambrano Hellion. Batallón San Patricio
40 112, Real de San Agustin, 66278 San Pedro Garza García, Nuevo Leon. México. Email:
41 jerjes@prodigy.net.mx, carlos.jerjes@udicem.org Telephone: +5281-88880000.
42
43
44

45 **Keywords:** Biomarkers; BNP; reference interval; newborn; preeclampsia
46

47 **Word count:** 3113.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Objective: To define and compare the reference interval of BNP in healthy newborns from healthy mothers and with severe preeclampsia.

Design: Prospective, multicenter, cross-sectional study.

Setting: Four obstetric wards of second-level academic hospitals.

Participants: 167 healthy newborns, from 146 healthy and 21 severe preeclamptic women. We included newborns from healthy mothers with full-term pregnancies (38 to 42 gestational weeks), who received adequate prenatal care, and who had Apgar scores ≥ 7 at 0 and 5 minutes. Newborns with chromosomopathies identified during prenatal consultations, those with respiratory distress, and those with cardiac or pulmonary disease detected in the first pediatric evaluation were excluded from this study. In the group of preeclamptic women, we considered the same inclusion criteria, but the patients also had to meet the diagnostic criteria for preeclampsia with severity features, according to the ACOG guidelines. The same exclusion criteria used for the healthy group was applied to the preeclampsia-associated newborn.

Interventions: A single blood sample from the umbilical cord artery after delivery (vaginal or cesarean section).

Primary outcome: Reference level of BNP in healthy newborns.

Results: In the healthy newborns group, the median BNP was 12.15 pg/mL (IQR 7.7 – 16.8 pg/mL) and in the preeclamptic group 20.8 pg/mL (IQR 5.8 – 46.5 pg/mL). The reference interval for BNP in healthy newborns was 5 (95% CI 5-5) - 34 pg/mL (95% CI 28.4-38.8). We identified higher expression of BNP in newborns from preeclamptic women overall ($p=0.037$, $r = 0.16$) and in newborns exposed to stress conditions, such as complications during labor and delivery ($p=0.004$, $r = 0.33$).

Conclusions: In healthy newborns, BNP concentrations at birth were lower than reported in other similar populations. In neonates with stress conditions, the higher expression of this biomarker establishes another possible link between stress and the cardiovascular response.

Trial registration: ClinicalTrials.gov: NCT02574806.

Article summary

Strengths and limitations of this study

- First prospective multicenter cohort study aimed to determine the reference interval of BNP in the healthy newborn after delivery.
- Study population, sample size, and statistical analysis were defined according to the guidelines from the Clinical & Laboratory Standards Institute.
- There were no serial measurements of BNP for follow-up.
- The study is limited only to BNP, due to its relevance as a marker of ventricular dysfunction.
- No imaging tools were used for structural and functional assessment.

Original protocol available at Supplementary material.

Funding statement: This study was supported by Endowed Chair in Cardiology (Tecnológico de Monterrey, 0020CAT131); CONACYT (Grant 151136, 133591, 269399) and Xignus Research Fund.

Disclosure of interest: None declared.

Authors contribution: D.R. contributed to the design and implementation of the protocol, the analysis of the results, and the writing of the manuscript. G.GR contributed to the analysis of the results and the writing of the manuscript. E.LS. contributed to the analysis of the results and the writing of the manuscript. J.Y. contributed to the design of the protocol, the analysis of the results, and the writing of the manuscript. G.TA. contributed to the design of the protocol, the analysis of the results, and writing the manuscript. C.JS contributed to the design and implementation of the protocol, the analysis of the results and the writing of the manuscript.

Data sharing statement: The authors do not have permission to share data since our informed consent form did not inquire for permission to share data.

Introduction

Several studies have proved the B-type natriuretic peptide (BNP) as a promising diagnostic and stratification biomarker in multiple clinical settings concerning the adult population [1]. In pediatric patients with cardiac disorders, BNP is an essential tool for diagnosis, risk stratification, and prognosis [2]. Since elevated expression of BNP in the pediatric population has been associated with poor ventricular function and outcomes as seen in patent ductus arteriosus, persistent pulmonary hypertension of the newborn, and stress transient cardiomyopathy [3,4]. However, newborns have peak levels in the first days of life, which decrease within the first week and vary greatly [5]. The published normal range of BNP and the amino-terminal segment of its prohormone (NT-pro-BNP) appear to have an age- and gender-dependent trend [6]. The ample range of blood concentrations of both biomarkers can be attributed to several perinatal factors that may be influencing myocardial performance during the postnatal transition period [5,7–10]. Despite aforementioned data [3,4], perhaps BNP, is not the best option as a biomarker in neonates [6]. On the other hand, in newborns with acute respiratory distress, a normal BNP value may have a high negative predictive value for ruling out ventricular dysfunction from other acute disorders (i.e., respiratory distress, sepsis, or metabolic alterations), improving the quality of medical care. Additionally, preeclampsia is a vascular disorder that increases maternal and fetal/neonatal morbidity and mortality [11], increases BNP expression [12] and has deleterious effects on the cardiovascular system of the newborn [13]. Whether these maternal mechanisms influence the expression of BNP in the newborn is an unmet question. Currently, BNP concentration has an impact in early disease stratification. Nonetheless, its role and the normal concentrations in the healthy neonatal population has not been elucidated. Also, the influence of maternal preeclampsia on the cardiovascular system of the newborn is not well known. Therefore, we conducted the first prospective, multicenter, cross-sectional study to establish the reference interval of BNP in healthy newborns (HN), and thereafter compared BNP concentrations between newborns of healthy and preeclamptic mothers.

Methods

Study design

A multicenter, prospective, cross-sectional study was designed to establish the reference interval of BNP in HN at birth and to compare it with those in offspring of preeclamptic mothers. The study was conducted at the obstetrics wards of four academic-hospitals, during the period from April 2014 to April 2015. Medical health records were reviewed to assess the potential eligibility of each participant, and a direct interview confirmed that all inclusion criteria were met. Inclusion criteria: 1) newborns from healthy mothers with full-term pregnancies (38 to 42 gestational weeks), 2) who received adequate prenatal care, and 3) who had Apgar scores ≥ 7 at 0 and 5 minutes. Exclusion criteria 1) newborns with chromosomopathies identified during prenatal consultations, 2) those with respiratory distress, and 3) those with cardiac or pulmonary disease detected in the first pediatric evaluation. In the group of preeclamptic women, we considered the same inclusion criteria, but the patients also had to meet the diagnostic criteria for preeclampsia with severity features, according to the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) guidelines. The same exclusion criteria used for the HN group was applied to the preeclampsia-associated newborn (PAN) group (Figure 1).

We collected a single whole blood sample from the umbilical cord artery after delivery (vaginal or cesarean section) in 4 mL spray-coated K2EDTA tubes (BD Vacutainer®), which was immediately processed and analyzed eliminating need for storage. Arterial blood was preferred over venous blood because this would allow a direct measurement of BNP concentration from the bloodstream of the newborn. After determining the BNP reference interval in HN, this group was compared with newborns from mothers with severe preeclampsia. Anthropometry and clinical status were obtained from the records of attending pediatricians and neonatologists. All infants were evaluated in the nursery ward during the first hours of the neonatal period to ascertain their health status. Written informed consent was obtained from all mothers before newborns enrollment. This study was conducted according to the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Research

Committees of the Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey. The trial was registered in ClinicalTrials.gov: NCT02574806.

BNP measurement

BNP was measured by using the Triage® MeterPlus and Triage® BNP Test (Alere™). The Triage BNP assay is a rapid, point of care fluorescence immunoassay for the quantitative measurement of BNP in potassium ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) anticoagulated whole blood or plasma specimens [14]. In brief, the sample reacts with fluorescent antibody conjugates and flows through the test device by capillary action. Complexes of fluorescent antibody conjugate are captured in a specific area for BNP. BNP concentration in the specimen is directly proportional to the fluorescence detected, and in approximately 15 minutes, a result is obtained. The measurement range of the BNP assay is 5 pg/mL to 5000 pg/mL. A measurement range > 100 pg/mL is determined as abnormal by the equipment referencing literature [14].

Study Definitions

A healthy mother was considered as a biological female between 15 and 36 years old, without chronic disease history or pregnancy-associated diseases. Adequate prenatal care was defined using the World Health Organization criterion, consisting of at least five obstetric office visits. Severe preeclampsia was diagnosed according to the ACOG criteria which consists of: the presence of preeclampsia with systemic involvement, including heart failure, visual or cerebral disturbances, thrombocytopenia, abnormal liver tests and/or renal failure [15]. Complicated delivery was defined as prolonged labor (≥ 14 hours), evidence of abnormal antenatal cardiotocographic records, no reassuring fetal status, amniotic fluid abnormalities (i.e., volume disturbances, meconium), aspiration of meconium during birth or umbilical cord compression.

Statistical analysis

The sample size was determined based on the guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute, which establishes that the minimum sample of healthy reference subjects required to obtain a reference interval with a 95% CI is 146 subjects [16–18]. Continuous variables

were expressed as mean \pm standard deviation. Furthermore, categorical variables were expressed as numbers and percentages. All values are rounded to the nearest tenth decimal. Values of BNP were shown as median and interquartile range (IQR). The reference interval of BNP in HN was determined by estimation of the 2.5th and 97.5th percentile with 95% confidence interval (95%CI), by parametric or non-parametric methods depending on BNP values distribution, as recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute [17]. For non-parametric continuous variables, we used Mann-Whitney U test to compare BNP expression between groups. Chi-square tests for association were conducted to evaluate percentage differences between categorical variables among newborns from HN and PAN groups. A probability of alpha-error < 0.05 was considered for significant results. Statistical analysis was performed using the Statistics Package for the Social Sciences (SPSS) from IBM Corporation, version 22, and Stata/IC 14.2 for Mac (College Station, TX). Graphs were made with Prism 7 for Mac OS X.

Patient involvement

No patients were involved in the planning of this research.

Results

From April 2014 to April 2015, 167 samples were collected in two hospitals from the public sector and two from the private sector; 146 newborns were categorized as the healthy group, and 21 as the preeclampsia group. The latter group was composed by newborns from mothers who developed preeclampsia during the third trimester of pregnancy, requiring admission to the obstetric intensive care unit (Table 1). Maternal population was younger, with all HN delivered at term, and high incidence of spontaneous labor and rupture of membranes (Table 1). Both the HN and PAN groups had similar proportions of nulliparous and multiparous mothers and small percentages of previous miscarriages or abortions. A high rate of newborn deliveries in HN and PAN groups were performed by cesarean section. We observed delivery complications in 15.8% and 33.3% neonates from the HN and PAN group, respectively. From the PAN group, 24% neonates presented cyanosis and 14.2% respiratory distress. There was no missing data.

A non-normal distribution of BNP values was found both study groups by visual histogram inspection and the Shapiro-Wilk test ($p<0.05$) (Figure 2). Therefore, we decided to follow a non-parametric analysis approach to determine the reference interval and assess group differences in BNP concentrations. In the healthy group, the BNP median was 12.15 pg/mL (IQR 7.7 – 16.8 pg/mL) and in the preeclamptic group 20.8 pg/mL (IQR 5.8 – 46.4 pg/mL). The reference interval of BNP in healthy newborns based on 2.5th and 97.5th percentiles was 5 (95% CI 5-5) - 34 pg/mL (95% CI 28.4-38.8) (Figure 3). Offspring from the PAN group had significantly higher BNP levels compared to those in the HN ($p = 0.037$), with a small effect size, $r = 0.16$. Almost one third of the PAN group (28.6%) were outside the reference range. Figure 3 shows BNP concentrations in HN and PAN groups. Additionally, subgroup analyses between HN and PAN group are shown in Table 2. Children from the HN group delivered by C-section had significantly higher ($p=0.018$) BNP values than those born by vaginal delivery, although with a small effect size, $r = 0.19$ (median 13.8 pg/ml, IQR 8.9-18.1 pg/mL vs 11.2 pg/mL, IQR 6.8-15.3 pg/mL, respectively). The Mann Whitney U test that evaluated BNP concentrations between newborns in the PAN group with and without delivery complications was also significant, in the expected direction ($p=0.038$), and with a moderate effect size, $r = 0.45$. Those babies with delivery complications had higher BNP values [median 47.9 pg/mL (IQR= 12.2-62.6 pg/mL)] compared to the ones with non-complicated deliveries [median 15.5 pg/mL (IQR= 5.0-25.4 pg/mL)]. Also, we identified that complicated deliveries in the PAN group had higher expression of BNP than those babies with complicated delivery in the HN group ($p=0.004$, $r=0.33$). Medians, interquartile range (IQR) and significant differences are shown in Table 2.

Lastly, chi-square tests for association were conducted to evaluate percentage differences in labor initiation, a method of membrane rupture, the use of analgesia during delivery, development of delivery complications, the presence of cyanosis or respiratory distress, and admission to the neonatal intensive care unit among newborns from HN and PAN groups. Analyses showed no significant association with spontaneous or induced labor initiation ($p = 0.209$), the method of membrane rupture ($p = 0.059$), use of analgesia during labor ($p = 0.75$), nor for the presence of

1
2
3 delivery complications ($p = 0.109$) with HN or PAN groups. However, significant association was
4 found between newborns born from preeclamptic mothers and the presence of cyanosis ($\chi^2(1)=$
5 3583, $p= 0.000$, Cramer's $V= 0.46$); the development of respiratory distress ($\chi^2(1)= 21.23$, $p= 0.000$,
6 Cramer's $V= 0.35$); and admission to neonatal intensive care unit ($\chi^2(1)= 21.23$, $p= 0.000$, Cramer's
7 $V= 0.35$).
8
9
10
11

12 Discussion

13

14

15 The results from this multicenter study provide three important observations regarding the use of
16 BNP concentrations in the pediatric population. Firstly, BNP concentrations were lower in healthy
17 offspring population at birth, compared to those observed in similar populations and lower than the
18 values detected in pediatric [7,19] and adult patients [12]. Secondly, higher BNP concentrations in
19 newborns with two stressors (i.e., preeclampsia and complicated delivery) contributes to elucidate
20 another link between stress and cardiac response [20]. Lastly, high peak levels of BNP
21 concentrations known to be present at birth, as a consequence of the physiological conditions of the
22 newborn, were not observed in our HN group.
23
24
25
26
27
28
29
30

31 BNP and the inactive NT-pro-BNP levels are reasonably correlated, and either of them can be used
32 in patient care. Although the usefulness of BNP concentrations in identifying different ventricular
33 dysfunction stages or mortality risks in the adult [21] and pediatric populations [4,7,19] has been
34 well established, studies in children are more challenging and remain limited than those in adults.
35 One of the most important factors promoting this limitation is the lack of normative biomarker values
36 in children [19]. Additionally, average adult BNP values vary depending on the assay method and
37 patient demographics; whereas appropriate reference values are lacking in children.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Our results show that in HN at birth, BNP concentration was lower [median 12.15 pg/mL (IQR 7.7 –
50 16.8 pg/mL)] than that reported in other neonate populations [96 pg/mL (mean 134 ± 130 pg/mL)]
51 without disease [7]. Although, in this study, newborns included had signs and symptoms of a
52 cardiovascular disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
53 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
54 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
55 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
56 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
57 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
58 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
59 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
60 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular

1
2
3 illness with or without anatomic defect [7]. Most studies show high levels of BNP and NT-pro-BNP
4 immediately after birth, decreasing during the third or fourth day of life [22,23]. Other reports
5 indicate a tendency or significant decrease in BNP concentrations, suggesting that the peptide
6 levels are dependent on age, the assay used for its measurement, and possibly the gender [10].
7 Additionally, a BNP cut-off value of 170 pg/mL during the first 7 days of extrauterine life and value
8 of 41 pg/mL for those older than 7 days but younger than 19 years-old has been established [7].
9
10
11
12
13
14
15

16 In our results, BNP expression was independent of maternal characteristics including age, and
17 obstetric history. However, we did find increased BNP values in babies delivered by C-section, but
18 only in the HN group. This finding is in accordance with previous studies that have reported that
19 BNP expression was dependent on delivery method [22–24].
20
21
22
23
24
25

26 Even though the reason for higher NT-pro-BNP or BNP values soon after birth remains unknown,
27 several mechanisms have been considered, its role in the homeostasis, increased body water,
28 myocardium stiffness, etc. [7]. Moreover, newborns may be less responsive to natriuretic peptides,
29 so a higher secreted level may be required to promote the well-recognized natriuresis that
30 commences within the first week of life. During this time, the precipitous decrease in pulmonary
31 vascular resistance may also be promoted by natriuretic peptides [7]. On the other hand, our results
32 suggest that perinatal factors related to postnatal transition do not have any influence on myocardial
33 performance. Since current and strong evidences [25–27] support that BNP does not cross the
34 placental barrier, so these values only reflect the myocardial performance to extrauterine life.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 The whole blood BNP concentrations (median 12.15 pg/mL, IQR 7.7 – 16.8 pg/mL) observed in our
46 HN population were similar to BNP levels throughout pregnancy in healthy women [12], suggesting
47 that a BNP concentration > 20 pg/mL in pregnant women and newborns may indicate ventricular
48 stress and/or subclinical cardiac dysfunction. Currently, in adult patients ventricular dysfunction is
49 unlikely when BNP concentrations are < 100 pg/mL. However, some studies have suggested that a
50 cut-off value of 50 pg/mL, rather than 100 pg/mL, will increase its sensitivity and negative predictive
51 value [28].
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 value in adult or pediatric populations [28]. The clinical implications of our findings suggest that in
4 newborns a reference interval of 5 (95% CI 5-5) - 34 pg/mL (95% CI 28.4-38.8) instead of < 100
5 pg/mL could increase its sensitivity and the negative predictive value reducing the proportion of
6 false positives. BNP expression superior to the obtained reference interval could be considered as
7 a gray zone of this biomarker, without clinical relevance in early phases. However, if this abnormal
8 expression could have further clinical implications is an unsolved question. It is possible that the
9 lower BNP concentrations observed in our study, as suggested by other observations
10 [3,7,10,29,30], may depend on racial or genetic characteristics. Recently, results support this
11 consideration based on higher BNP concentrations (32.02 ± 3.37 pg/mL, mean \pm SE) compared to
12 our HN population [31]. However, the mechanisms behind this finding remain as an unresolved
13 question.
14
15

16 Another relevant result was higher BNP concentrations in neonates under two stressors (maternal
17 preeclampsia and delivery complications), compared to HN (median 47.9, IQR 12.6 – 62.6 pg/mL,
18 vs 8.9, IQR 6.7 – 13.7 pg/mL, $p=0.004$, $r=0.33$) despite a good adaptation to extrauterine life. In the
19 short-term follow-up, we did not observe a clinical important difference, since BNP concentrations
20 were not associated with need for a specialist consultation, NICU transfer, death, or congenital
21 cardiac disease. Although the stress role in cardiovascular disorders has been well established [20],
22 its participation in other pediatric clinical models [21] is still uncertain. Since there is an embryologic
23 link between neurologic diseases and cardiomyopathy (common neuroectodermal origin),
24 catecholaminergic overexpression in neuroendocrine disease may elicit an abnormal response in
25 the myocardial adrenergic receptors. Thus, in early stages, if this overexpression is not sustained,
26 cellular disarray could induce higher BNP concentrations. In late stages, and under conditions of
27 continued stress, this mechanism could be linked to several models of transient hypertrophic
28 cardiomyopathy [21].
29
30

31 Lastly, although despite previous evidence establishing different BNP concentrations depending on
32 the type of delivery [22–24] and by the presence of preeclampsia [2], our results did not reproduce
33
34

1
2
3 these observations. Our study group only showed increased BNP concentrations in neonates who
4 were born by C-section from healthy mothers. Also, no differences among delivery type and BNP
5 concentrations were identified.
6
7

8
9
10 There are several potential limitations of our study. A major limitation was the lack of long-term
11 follow-up of the offspring, with pediatric visits and blood draws to establish serial measurements of
12 BNP which could help determine its prognostic value of BNP for cardiovascular conditions during
13 different stages of growth and development along with its relevance for chronic diseases. However,
14 our aim was only to focus on the assessment of BNP expression in the HN as a tool for clinical-
15 decision making in the compromised neonate. Additionally, maternal BNP concentrations were not
16 obtained, nor other biomarkers or imaging diagnostic tools were used. The influence of the
17 placenta on biomarker levels was not examined by this study, and the sample size of the newborns
18 from mothers with preeclampsia is small compared to the HN group (21 vs 146). Thus; the reader
19 should be cautious when interpreting our results since only large differences between the HN and
20 PAN groups will be statistically significant. However, we identified that stress conditions
21 (preeclampsia and complicated delivery) are triggers that increase BNP expression, but it will be
22 necessary to evaluate this finding in more extensive studies focused on a preeclamptic population.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

Clinical implications

38
39 Newborns at birth with respiratory distress present an extra challenge to most physicians because
40 of a lack of a well-communicated history. Rapid evaluation is needed so that they can be referred
41 quickly to the correct physician (i.e., cardiologist or pulmonologist) to receive appropriate treatment.
42 If our results are reproduced, BNP concentrations could have a great future as a biomarker. In our
43 population, the upper limit of BNP expression in the HN is < 40 pg/mL, if this result is reproduced in
44 future studies, this value could be used to address the clinical suspicion about the etiology of the
45 acute respiratory distress shortening the time to diagnosis and undergo specialized treatment.
46
47
48
49
50
51
52
53
54

Conclusion

In healthy newborns, BNP concentration at birth was lower than previously reported in similar populations. Neonates under stress conditions related to complications at birth showed a higher expression of this biomarker, which elucidates a possible link between stress and the corresponding cardiovascular response in this population.

Acknowledgments: Thanks to *Werfen IL, Mexico* for providing equipment and supplies, as well as to the team of doctors and fellows of Gynecology and Obstetrics and Pediatrics of Programas Multicéntricos de Residencias Médicas, Tecnológico de Monterrey. Special thanks to Dr Flores-Tamez, for his support and giving us access to the facilities for the development of the study. To Dr Kristopher J. Currie G for editorial assistance.

References

- 1 Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007;**50**:2357–68.
2 doi:10.1016/j.jacc.2007.09.021
- 3 Vijlbrief D. *Cardiac biomarkers in Neonatology*. Utrecht University 2015.
- 4 El-Khuffash A, Molloy EJ. Are B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal-pro-BNP useful in neonates? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007;**92**:F320–4. doi:10.1136/adc.2006.106039
- 5 Yañez J, Rodriguez D, Treviño C, et al. Stress transient hypertrophic cardiomyopathy and B-type natriuretic peptide role. *Pediatr Cardiol* 2013;**34**:702–6. doi:10.1007/s00246-012-0317-5
- 6 Koch A, Singer H. Normal values of B type natriuretic peptide in infants, children, and adolescents. *Heart Br Card Soc* 2003;**89**:875–8.
- 7 Ten Kate CA, Tibboel D, Kraemer US. B-type natriuretic peptide as a parameter for pulmonary hypertension in children. A systematic review. *Eur J Pediatr* 2015;**174**:1267–75. doi:10.1007/s00431-015-2619-0
- 8 Law YM, Hoyer AW, Reller MD, et al. Accuracy of plasma B-type natriuretic peptide to diagnose significant cardiovascular disease in children: the Better Not Pout Children! Study. *J Am Coll Cardiol* 2009;**54**:1467–75. doi:10.1016/j.jacc.2009.06.020
- 9 Smith J, Goetze JP, Andersen CB, et al. Practical application of natriuretic peptides in paediatric cardiology. *Cardiol Young* 2010;**20**:353–63. doi:10.1017/S1047951110000211
- 10 Koch A, Zink S, Singer H. B-type natriuretic peptide in paediatric patients with congenital heart disease. *Eur Heart J* 2006;**27**:861–6. doi:10.1093/eurheartj/ehi773
- 11 Nir A, Lindinger A, Rauh M, et al. NT-pro-B-type natriuretic peptide in infants and children: reference values based on combined data from four studies. *Pediatr Cardiol* 2009;**30**:3–8. doi:10.1007/s00246-008-9258-4
- 12 Backes CH, Markham K, Moorehead P, et al. Maternal Preeclampsia and Neonatal Outcomes. *J Pregnancy* 2011;**2011**:1–7. doi:10.1155/2011/214365
- 13 Resnik JL, Hong C, Resnik R, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide (BNP) levels in normal and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* 2005;**193**:450–4. doi:10.1016/j.ajog.2004.12.006
- 14 Hakim J, Senterman MK, Hakim AM. Preeclampsia Is a Biomarker for Vascular Disease in Both Mother and Child: The Need for a Medical Alert System. *Int J Pediatr* 2013;**2013**:1–8. doi:10.1155/2013/953150
- 15 Inverness Medical. Triage BNP product insert. 2009. <http://www.alere.com/en/home/product-details/triage-bnp-test.html>
- 16 Chaiworapongsa T, Chaemsathong P, Yeo L, et al. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* 2014;**10**:466–80. doi:10.1038/nrneph.2014.102
- 17 Determining Laboratory Reference Intervals: CLSI Guideline Makes the Task Manageable. *Lab Med* 2009;**40**:75–6. doi:10.1309/LMEHV3HP39QOFJPA

- 1
2
3 17 Horowitz GL, Clinical and Laboratory Standards Institute. *Defining, establishing, and verifying*
4 *reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*. 2010.
5
6 18 Katayev A, Balciza C, Seccombe DW. Establishing reference intervals for clinical laboratory
7 test results: is there a better way? *Am J Clin Pathol* 2010;133:180–6.
8 doi:10.1309/AJCPN5BMTSF1CDYP
9
10 19 Bernus A, Wagner BD, Accurso F, et al. Brain Natriuretic Peptide Levels in Managing Pediatric
11 Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 2009;135:745–51. doi:10.1378/chest.08-
12 0187
13
14 20 Black PH, Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*
15 2002;52:1–23.
16
17 21 Jerjes-Sanchez C, Garcia N, Leon-Gonzalez ED de, et al. Significance of Biomarker Panel
18 Including Cardiac Troponin I, D-dimer, and B-Type Natriuretic Peptide in Acute Aortic
19 Dissection. *J Cardiol Ther Published Online First*: 2013. doi:10.12970/2311-052X.2013.01.02.4
20
21 22 Gemelli M, Mamì C, Manganaro R, et al. Effects of the mode of delivery on ANP and renin-
22 aldosterone system in the fetus and the neonate. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*
23 1992;43:181–4.
24
25 23 Seong WJ, Yoon DH, Chong GO, et al. Umbilical cord blood amino-terminal pro-brain
26 natriuretic peptide levels according to the mode of delivery. *Arch Gynecol Obstet*
27 2010;281:907–12. doi:10.1007/s00404-009-1253-3
28
29 24 Fortunato G, Carandente Giarrusso P, Martinelli P, et al. Cardiac troponin T and amino-terminal
30 pro-natriuretic peptide concentrations in fetuses in the second trimester and in healthy
31 neonates. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:834–6. doi:10.1515/CCLM.2006.144
32
33 25 Mulay S, Varma DR. Placental barrier to atrial natriuretic peptide in rats. *Can J Physiol
34 Pharmacol* 1989;67:1–4.
35
36 26 Bakker J. Reference Values for N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Umbilical Cord
37 Blood. *Clin Chem* 2004;50:2465–2465. doi:10.1373/clinchem.2004.040253
38
39 27 Zhu R, Nie Z. A Clinical Study of the N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide in Myocardial
40 Injury after Neonatal Asphyxia. *Pediatr Neonatol* 2016;57:133–9.
41 doi:10.1016/j.pedneo.2015.08.001
42
43 28 Omar HR. Acute cardiogenic pulmonary edema with normal BNP: the value of repeat BNP
44 testing. *Am J Emerg Med* 2015;33:605.e5-605.e6. doi:10.1016/j.ajem.2014.10.006
45
46 29 Mir TS, Laux R, Hellwege HH, et al. Plasma concentrations of aminoterminal pro atrial
47 natriuretic peptide and aminoterminal pro brain natriuretic peptide in healthy neonates: marked
48 and rapid increase after birth. *Pediatrics* 2003;112:896–9.
49
50 30 Mannarino S, Garofoli F, Mongini E, et al. BNP concentrations and cardiovascular adaptation in
51 preterm and fullterm newborn infants. *Early Hum Dev* 2010;86:295–8.
52 doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.04.003
53
54 31 Blohm ME, Arndt F, Sandig J, et al. Cardiovascular biomarkers in paired maternal and umbilical
55 cord blood samples at term and near term delivery. *Early Hum Dev* 2016;94:7–12.
56 doi:10.1016/j.earlhumdev.2016.01.001
57
58
59
60

Table 1. Demographic and clinical characteristics of healthy and preeclamptic mothers and newborns.

Characteristics	Healthy group, n=146 Median [Q1-Q3], No. (%)	Preeclamptic group, n=21 Median [Q1-Q3], No. (%)	p-value
Mothers			
Age (years)	23.5 [18 – 29]	21 [18 – 28]	0.48
Public sector	118 (80.8)	21 (100)	0.026
Gravidity >1	76 (52)	9 (43)	0.43
Abortion >1	4 (2.7)	1 (4.8)	0.61
Gestational age (weeks)	39.5 [38.5 – 40.2]	38.4 [37.2 – 40.2]	0.005
Spontaneous labour	76 (52)	14 (66.7)	0.20
Spontaneous ruptures of membranes	87 (59.6)	17 (81)	0.058
Epidural analgesia	141 (96.6)	20 (95.2)	0.75
Normal delivery	79 (54.1)	3 (14.3)	0.0007
Newborns			
Male	79 (54.1)	6 (28.6)	0.02
Apgar score at 0 minutes	8 [8 – 9]	8 [8 – 8]	0.014
Apgar score at 5 minutes	9 [9 – 9]	9 [9 – 9]	0.005
Weight (kg)	3.3 [3.0 – 3.5]	3 [2.7 – 3.3]	0.009
Estimated gestational age by Dubowitz score (weeks)	39.2 [38.4 – 40.1]	38.3 [37 – 39.6]	0.005
Complicated delivery	23 (15.8)	7 (33.3)	0.049
Cyanosis	0	5 (23.8)	0
Respiratory distress	0	3 (14.2)	0.0017

Tables

1	
2	
3	Nursery
4	146 (100)
5	18 (85.7)
6	0.0017
7	Neonatal intensive care unit
8	0
9	3 (14.2)
10	0.0017
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	
41	
42	
43	
44	
45	
46	
47	
48	
49	
50	
51	
52	
53	
54	
55	
56	
57	
58	
59	
60	

For peer review only

1
2 Table 2. Subgroup analysis of median B-type natriuretic peptide of HN and PAN groups.
3
4

	Healthy newborns		Preeclampsia-associated newborns	
	BNP Median (Q1-Q3)	p-value	BNP Median (Q1-Q3)	p-value
Overall BNP	12.1 (7.7-16.8)	-	20.8 (5.8-46.4)	0.037*
Sex				
Male	12.0 (7.5-16.9)	0.91	11.15 (5.0-49.5)	0.51
Female	12.2 (8.4-16.0)		22.3 (9.9-45.1)	
Delivery				
Spontaneous	11.8 (7.7-16.0)	0.56	21.5 (11.6-36.4)	0.74
Induced labor	12.5 (8.3-17.4)		6.3 (5.0-57.6)	
Analgesia				
Epidural analgesia	11.8 (7.7-16.6)	0.08	18.4 (5.5-41.9)	0.38
Non-analgesia	14.3 (12.7-27.7)		54.5 (54.5-54.5)	

Delivery method				
Vaginal delivery	11.2 (6.8-15.3)	0.01	32.6 (15.1-32.6)	0.41
C-section	13.8 (8.9-18.1)		18.4 (5.2-45.7)	
Membrane rupture				
Spontaneous	11.7 (7.2-15.8)	0.05	20.8 (8.1-38.8)	1
Artificial rupture of membranes	13.8 (8.7-19.2)		31.3 (5.0-61.3)	
Complications				
Delivery complications	8.9 (6.7-13.7)	0.11	47.9 (12.2-62.6)	0.038
Normal delivery	12.3 (8.3-16.8)		15.5 (5.0-25.4)	

The overall BNP row describes the comparison of the median BNP measurement of the HN and PAN groups. The remaining rows are comparisons between each subgroup with the corresponding p-value.

1
2
3 **Figure captions**
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- **Figure 1.** Flow diagram of study and BNP values.
- **Figure 2.** Shows the distribution of the BNP values in HN group. The right-skewed distribution was related to the limit of quantification of the equipment (5 pg/mL). Thus, a logarithmic transformation was performed. However, the distribution remains right-side skewed. Consequently, the reference interval was estimated using the rank-based method for non-parametric distribution.
- **Figure 3.** Box plot of reference interval of BNP values in HN and PAN group (whiskers represent 2.5th and 97.5th percentiles).

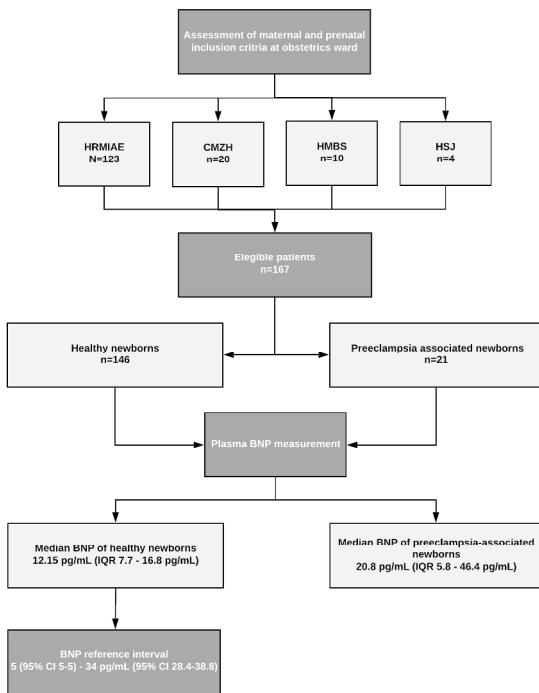
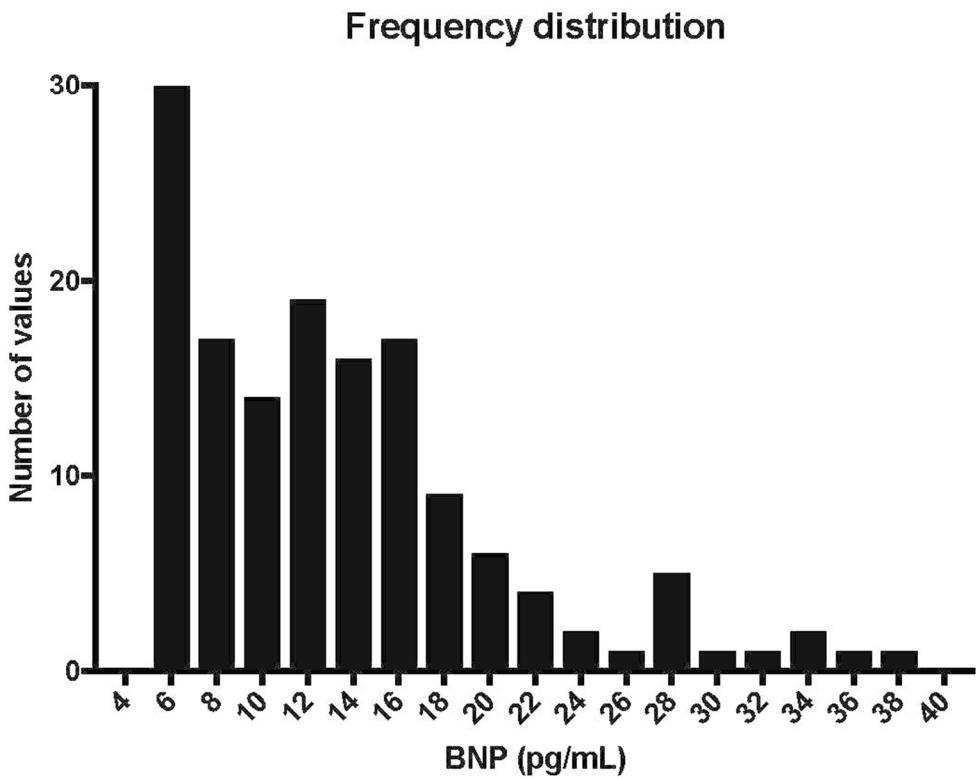


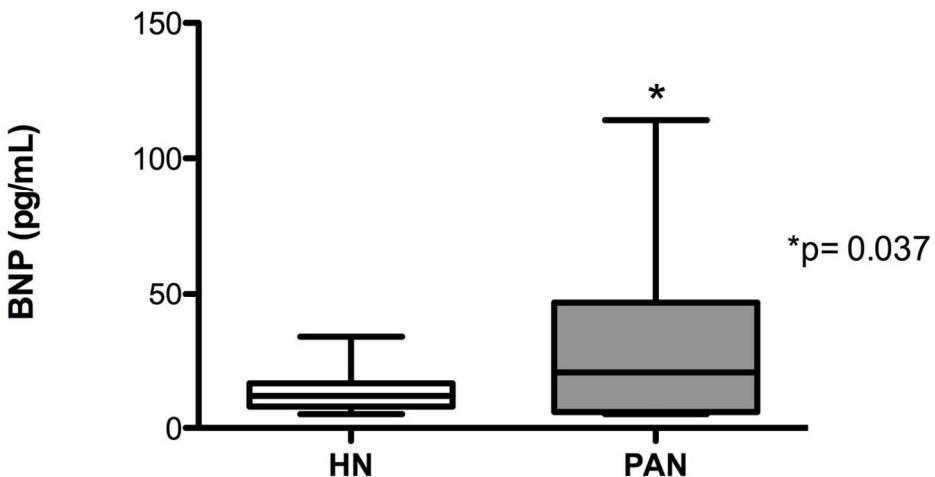
Figure 1. Flow diagram of study and BNP values

279x215mm (300 x 300 DPI)



- Figure 2. Shows the distribution of the BNP values in HN group. The right-skewed distribution was related to the limit of quantification of the equipment (5 pg/mL). Thus, a logarithmic transformation was performed. However, the distribution remains right-side skewed. Consequently, the reference interval was estimated using the rank-based method for non-parametric distribution.

91x72mm (300 x 300 DPI)



• Figure 3. Box plot of reference interval of BNP values in HN and PAN group (whiskers represent 2.5th and 97.5th percentiles).

125x66mm (300 x 300 DPI)

Protocolo EBNPRNS01

“Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”.

Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Departamento de Cardiología Pediátrica.
Instituto de Cardiología y Medicina Vascular
Centro Médico Zambrano Hellion- Tec Salud
Email: jmysanchez@itesm.mx

Tabla de contenidos

Síntesis	5
Planteamiento del problema	7
Antecedentes	8
Justificación	8
Objetivo	8
Diseño de estudio	9
Metodología del estudio.....	10
<i>Materiales</i>	10
<i>Lugar donde se realizará el estudio</i>	10
<i>Universo, muestra y tamaño de la muestra</i>	10
<i>Método de selección de pacientes</i>	11
<i>Criterios de inclusión, exclusión y suspensión de los participantes</i>	11
<i>Análisis de observaciones</i>	11
<i>Técnicas, procedimientos y métodos de confiabilidad</i>	12
<i>Diseño general del estudio</i>	13
<i>Calendarización del estudio</i>	13
<i>Manejo de datos</i>	14
Aspectos éticos.....	14
<i>Clasificación de la investigación</i>	14
<i>Revisión por comité de ética</i>	14
<i>Información y Consentimiento</i>	15
<i>Riesgos previsibles y probables</i>	15
<i>Eventos Adversos</i>	15
<i>Protección frente al riesgo físico y/o emocional</i>	15
<i>Confidencialidad (Archivo Confidencial de la investigación)</i>	15
Diseminación de Datos y Publicación	16
Organización.....	16
<i>Recursos humanos</i>	16
<i>Recursos materiales</i>	17
<i>Capacitación del personal</i>	17
Financiamiento	17
<i>Origen del material</i>	17
Bibliografía	18
Anexos	19
<i>Formato de historia clínica EBNPRNS01</i>	19
<i>Formato resultado PNC EBNPRNS01</i>	20
<i>Consentimiento informado para los padres</i>	21

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez. 2

Datos de identificación

Protocolo: EBNPRNS01.

Titulado: "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano".

Investigador Principal.

Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Cardiólogo Pediatra. Instituto de Cardiología y Medicina Vascular. Centro Médico Zambrano Hellion – Tec Salud.

Batallón de San Patricio 112. Col. Real San Agustín. San Pedro Garza García, N.L. México.

Tel: 88880000

Co – investigador.

Dr. Héctor David Rodríguez Flores.

Médico Pasante en Servicio Social del Tecnológico de Monterrey.

Co- investigador.

Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz.

Cardiólogo FCCP. FACC. Instituto de Cardiología y Medicina Vascular. Centro Médico Zambrano Hellion – Tec Salud.

Departamentos participantes.

Cardiología Pediátrica del Instituto de Cardiología y Medicina Vascular.

Instituciones participantes.

Hospital San José – Tec Salud.

Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad – SSANL.

Hospital Metropolitano "Bernardo Sepúlveda" – SSANL.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

For peer review only. <http://bmjopen.bmjjournals.org/site/about/guidelines.xhtml>

1
2 Área de investigación.
3
4

5 Cardiología pediátrica, biomarcadores, recién nacido.
6
7

8 Línea de investigación.
9

10 Biomarcadores en recién nacido.
11
12

13 ¿En qué rama se realizará el estudio?
14

15 Cardiología pediátrica y biomarcadores.
16
17

18 Fecha probable de inicio y terminación del estudio.
19

20 Febrero de 2014 al 30 de Junio del 2014.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez. 4
For peer review only <http://bmjopen.bmjjournals.org/site/about/guidelines.xhtml>

Síntesis

Título	Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano.
Lugar de investigación	<ul style="list-style-type: none"> • Hospital San José – Tec Salud. • Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad – SSANL. • Hospital Metropolitano “Bernardo Sepúlveda” – SSANL.
Investigadores	<p>Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez. Dr. Héctor David Rodríguez Flores. Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz.</p>
Patrocinador	Instituto de Cardiología y Medicina Vascular – Centro Médico Zambrano Hellion.
Estudio clínico número	EBNPRNS01.
Aprobación del Comité de Ética	Aprobado.
Objetivos	Definir, establecer y verificar los valores del PNC del recién nacido en un sector de la población mexicana del estado de Nuevo León. Con la finalidad de determinar la utilidad clínica de este biomarcador en el paciente neonatal.
Diseño del estudio	<p>Clasificación del estudio: Original. Tipo de investigación: Observacional Características del estudio: Transversal. Tipo de análisis: Descriptivo. En relación al tiempo: Prospectivo.</p>

Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Sujetos	<p>Inclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hijos e hijas de madres aparentemente sanas de entre 15 y 36 años de edad sin diabetes ni patologías asociadas al embarazo. • Control prenatal adecuado: 5 consultas mínimo (OMS). • Edad gestacional a término: (38-42 sdg). <p>Exclusión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hijos e hijas de madre con patología previamente conocida. • Hijos e hijas con cromosomopatía detectada durante el control prenatal. <p>Suspensión:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Detección durante el estudio de alguno de los criterios de exclusión. • Decisión de los padres de abandonar el estudio.
Mediciones	Medición del PNC extraído del cordón umbilical en el minuto 0 (cero) del nacimiento.
Muestra	Tamaño de la muestra: 146.
Análisis de observaciones	Método no paramétrico de estimación. Prueba de Dixon para el análisis de las observaciones atípicas.

Planteamiento del problema

Los biomarcadores cardiacos son capaces de darnos información relevante sobre la estructura y función del miocardio y pueden ayudarnos a identificar enfermedades y su repercusión a nivel celular en el recién nacido a término¹. Entre los biomarcadores más utilizados se encuentran: los péptidos natriuréticos y troponinas. Los primeros están relacionados con el estrés cardiaco y tensión ventricular, mientras que las últimas están relacionadas con daño agudo del miocito.

La determinación de péptido natriurético cerebral (PNC) es utilizada como herramienta para el diagnóstico y pronóstico en el adulto con insuficiencia cardiaca derecha o izquierda con o sin función sistólica preservada, cardiomielitis hipertrófica, remodelación ventricular post infarto y displasia arritmogénica del ventrículo derecho.

Después del nacimiento, el ventrículo derecho del neonato se expone a una mayor presión pulmonar, por lo tanto, los niveles elevados del PNC estimulan la vasodilatación y la diuresis, desempeñando un papel fundamental en la adaptación hemodinámica después del nacimiento. La disminución de la presión pulmonar, debido a la expansión pulmonar, y el inicio de la diuresis con la maduración renal explican la subsecuente disminución de los valores del PNC. Sin embargo, el incremento en el uso de este biomarcador en la práctica clínica en nuestro medio justifica conocer valores de referencia , y estandarizar el método de medición. Lo cual haría posible su utilización con fines clínicos en el paciente neonatal con lo que podría mejorarse la calidad de la atención.

Antecedentes

Los valores normales del PNC en pediatría cada vez se definen más, tanto en cardiopatías congénitas como en adquiridas. Koch y cols., reportaron la variabilidad que tienen en la etapa neonatal⁴. Law y cols sugieren en neonatos como cifras normales 170 pg/ml y para niños mayores a esta edad 41 pg /ml; este corte tiene sensibilidad de 94% y especificidad de 87%².

Justificación

La medición del PNC adquiere gran relevancia, ya que puede ayudar en la práctica clínica a establecer la diferencia entre enfermedades pulmonares, infecciosas o metabólicas de aquellos con insuficiencia cardíaca izquierda con o sin función sistólica preservada de diversa etiología⁵, e iniciar un abordaje terapéutico temprano y específico que repercute de en el pronóstico del paciente.

Sin embargo, ningún estudio ha podido estandarizar los valores de corte normales para el neonato sano. Es por esto que se propone estandarizar el PNC en el paciente neonatal en nuestro medio.

Objetivo

Definir, establecer y verificar los valores del PNC del recién nacido en un sector de la población mexicana del estado de Nuevo León. Con la finalidad de determinar la utilidad clínica de este biomarcador en el paciente neonatal.

Diseño de estudio

Clasificación del estudio: Original.

Tipo de investigación: Observacional

Características del estudio: Transversal.

Tipo de análisis: Descriptivo.

En relación al tiempo: Prospectivo.

Metodología del estudio

Población: Recién nacidos sanos de madres entre los 15 y 36 años de edad, sin patología conocida previamente ni asociada al embarazo que cumplan con los criterios de inclusión.

Materiales

Kit de extracción de sangre: Lavander top. Invert 8 – 10x. Spray – dried potassium EDTA.
Hielera con geles de congelación para preservar las muestras a 4°C.
RayBio® sandwich ELISA kit ELH-BNP-001. RayBiotech Inc.
Lector Multi-modal de Microplacas Synergy HT™– BioTek Instruments™. Centrifuga Allegra 25R® – Beckman Coulter Inc.

Lugar donde se realizará el estudio

El estudio está proyectado a realizarse en los hospitales e instituciones de salud pertenecientes al programa de residencias médicas del Sistema Tec Salud: Hospital San José-Tec de Monterrey (Tec Salud), Hospital Regional Materno Infantil de Alta Especialidad (SSANL) y Hospital Metropolitano “Bernardo Sepúlveda”(SSANL).

Universo, muestra y tamaño de la muestra

Universo: Recién nacidos sanos de madres entre los 15 y 36 años de edad, sin patología conocida previamente ni asociada al embarazo que cumplan con los criterios de inclusión.

Muestra: Única y obtenida del cordón umbilical en el minuto 0 (cero) posterior al parto o cesárea.

Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2
3 **Tamaño de la muestra:** 146 pacientes que cumplan con los criterios de inclusión
4 establecidos para este proyecto⁶.
5
6
7
8

9 **Método de selección de pacientes**

10 Se seleccionarán a los recién nacidos sanos de madres entre los 15 y 36 años de
11 edad, sin patología conocida previamente ni asociada al embarazo que cumplan con
12 los criterios de inclusión.
13
14

15
16 Por consentimiento informado: el estudio se realizará sólo en los recién nacidos que
17 cuenten con un consentimiento informado debidamente llenado y firmado por los
18 padres o tutores (se anexan formatos).
19
20
21
22
23
24

25 **Criterios de inclusión, exclusión y suspensión de los participantes.**

26 **Inclusión:** Recién nacidos sanos de madres aparentemente sanas de entre 15 y 36
27 años de edad sin diabetes ni patologías asociadas al embarazo con control prenatal
28 adecuado de 5 consultas y edad gestacional a término: (38-42 sdg).
29
30

31 **Exclusión:** Recién nacidos de madres con patología previamente conocida y recién
32 nacidos con cromosomopatía detectada durante el control prenatal.
33
34

35 **Suspensión:** Detección durante el estudio de alguno de los criterios de exclusión o si
36 los padres deciden no participar más en el protocolo.
37
38
39

40 **Análisis de observaciones.**
41
42

43 El método de análisis que se utilizará para la determinación del intervalo de
44 referencia será el método no paramétrico de estimación, ya que no hace ninguna
45 suposición específica acerca de la distribución de probabilidad de los valores de
46 referencia observados. La evaluación de las observaciones atípicas será mediante la
47 prueba de Dixon⁶.
48
49
50

51
52
53
54
55
56
57 **Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”.** Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
58 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
59
60

Técnicas, procedimientos y métodos de confiabilidad

Método para Determinar los niveles séricos o tisulares del péptido natriurético cerebral (PNC, por sus siglas en inglés).

El método para la determinación de los niveles séricos de PNC está basado en la inmunodetección. Para la realización de este proyecto utilizaremos el método de inmunodetección en placa conocido como ELISA.

ELISA

Fundamento: el Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas o ELISA por sus siglas en inglés (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) es una técnica de inmunoensayo en la cual un anticuerpo unido a una enzima se utiliza para detectar los niveles del antígeno en cuestión. La técnica de ELISA tipo sándwich consiste en colocar un anticuerpo para nuestro antígeno (proteína de interés), un segundo anticuerpo conocido como anticuerpo anti-antígeno marcado (unido a una enzima, peroxisada) y un sustrato que utilizará dicha enzima, para provocar un cambio en la coloración, misma que será medida a través de espectrofotometría indicando por consiguiente, de una manera indirecta, la cantidad de antígeno presente.

Técnica: En una placa de 96 pozos, se coloca el anticuerpo dirigido para la captura de PNC (anti-PNC, sc-391192), se deja 16 hrs a temperatura de 4°C, con la finalidad de absorber el anticuerpo a la placa. Posteriormente la placa se lava con buffer de PBS pH 7.2 +/-0.2 y se bloquean los sitios libres de la placa con BSA al 1% en PBS-T (0.05%) durante una hora, con la finalidad de evitar la adherencia inespecífica del antígeno. Posteriormente se coloca la muestra de interés para capturar el PNC presente. Se deja incubar por un período de dos horas. Finalmente se coloca el anticuerpo secundario y se revela con avidina conjugada con peroxidasa por 30 minutos utilizando como sustrato ABTS (2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid, sc-251817). La absorbencia se mide a 405 y 650 nm. Las concentraciones de proteína se obtienen utilizando como estándar PNC comercial (B7313 SIGMA).

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Diseño general del estudio

De inicio a término, este proyecto está contemplado para una duración de 5 meses, dividiéndose en tres fases:

1. Primera fase, con duración de tres meses para la recolección y procesamiento de muestra y almacenamiento de datos.
2. Segunda fase, con duración de tres meses para el análisis estadístico de los datos recolectados mediante la creación de base de datos.
3. Tercera fase, con duración de dos meses para el análisis de resultados y la creación del reporte final en búsqueda de su publicación para su difusión dentro de la comunidad científica.

Tras la recolección y refrigeración de las muestras, deberán ser transportadas al laboratorio (ICMV) para su procesamiento.

Para el almacenamiento y análisis de datos se creará una base de datos que reúna las variables significativas del paciente con la finalidad de permitir un estudio estadístico eficiente. Además de mantenerse apagado a los lineamientos de confidencialidad y privacidad del paciente.

Calendarización del estudio

	2014				
	F	M	A	M	J
Recolección de muestra y datos	1	1	1		
Análisis estadístico		2	2	2	
Reporte de resultados			3	3	

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

- 1
- 2
- 3 ● **Fase 1:** Febrero 2014- Abril 2014:
 - 4 ○ Recolección de muestra y almacenamiento de datos obtenidos tras el
 - 5 procesamiento en laboratorio.
- 6
- 7 ● **Fase 2:** Marzo 2014 – Mayo 2014:
 - 8 ○ Creación de base de datos para análisis estadístico.
 - 9 ○ Análisis de resultados.
- 10
- 11 ● **Fase 3:** Mayo 2014 – Junio 2014:
 - 12 ○ Elaboración de reporte final.
 - 13 ○ Difusión dentro de la comunidad científica.
- 14
- 15
- 16
- 17
- 18
- 19
- 20
- 21
- 22
- 23
- 24
- 25
- 26
- 27
- 28
- 29
- 30
- 31
- 32
- 33
- 34
- 35
- 36
- 37
- 38
- 39
- 40
- 41
- 42
- 43
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50
- 51
- 52
- 53
- 54
- 55
- 56
- 57
- 58
- 59
- 60

Manejo de datos

Solamente los investigadores tendrán acceso a los datos recopilados durante el estudio.

La recolección de muestras sanguíneas será realizada por el co-investigador. La recopilación final de datos será realizada por el investigador principal. La identidad de los sujetos en cuestión será manejada como confidencial en todo momento y se les otorgara un número que servirá como identificación. Ninguna persona ajena a la investigación podrá alterar, utilizar o divulgar la información recolectada

Aspectos éticos

Clasificación de la investigación

Según el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, Artículo N° 17: Investigación con riesgo mínimo.

Revisión por comité de ética

Los investigadores se comprometen a someter el presente protocolo así como consentimiento informado al comité de ética. En caso de cambios en el protocolo el equipo de investigación se compromete a informar al comité de ética, lo mismo aplica en caso de presentarse alguna eventualidad durante el desarrollo del mismo.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1 2 **3 Información y Consentimiento**

3 Como requisito fundamental para formar parte del estudio, los padres del recién
4 nacido deben leer y firmar un consentimiento informado.

5 El documento en cuestión se encuentra redactado en terminología simple para
6 facilitar la comprensión del personal no médico. Se leerá y firmará durante el primer
7 contacto del investigador con los padres del recién nacido, previo a la recolección de
8 la muestra, en el cual los padres podrán externar sus comentarios y dudas respecto
9 al estudio.

10 11 12 13 14 15 16 17 18 **19 Riesgos previsibles y probables**

20 Debido a que el estudio está enfocado en la recolección de sangre del cordón
21 umbilical, se considera el riesgo de punción del personal encargado de la toma de la
22 muestra.

23 24 25 26 27 **28 Eventos Adversos**

29 Se definirá como evento adverso a cualquier situación o eventualidad que ponga en
30 riesgo el bienestar físico, emocional o social del participante en el estudio. En caso
31 de que se presenten eventos adversos el investigador principal se compromete a dar
32 aviso al comité de ética para buscar una recomendación.

33 34 35 36 37 **38 Protección frente al riesgo físico y/o emocional**

39 Toda la información recabada se manejará con absoluta discreción; tratándose como
40 información confidencial, de acuerdo a las reglas éticas de la institución
41 correspondiente.

42 43 44 45 46 **47 Confidencialidad (Archivo Confidencial de la investigación)**

48 En el manejo y archivo de los datos de los sujetos que participen en esta
49 investigación seguiremos lo indicado por la Ley Federal de Protección de Datos
50 Personales en Posesión de los Particulares del siguiente modo:

51 Toda la información de los pacientes asignados al protocolo será resguardada en el
52 expediente clínico de este, se les identificará con un número, el cual conocerán los

53
54
55
56
57
58
59
60 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
For peer review only. <http://bmjopen.bmjjournals.org/site/about/guidelines.xhtml>

1
2
3 padres y sólo los investigadores tendrán acceso a éstos. Se protegerán los datos
4 personales de los pacientes, de manera tal que sólo se utilizará el número asignado
5 al paciente para identificación de muestras, estudios y no serán utilizados éstos para
6 ningún otro protocolo o investigación.
7
8

9
10
11 No existirá remuneración económica por participar en este estudio. Queda bajo la
12 responsabilidad de los médicos tratantes el cuidado y manejo de los recién nacidos
13 que participen en el estudio.
14
15

21 Diseminación de Datos y Publicación

22 Al contar con los resultados del estudio, se presentarán dentro de la comunidad
23 científica en alguna de las revistas indexadas en las áreas de pediatría y cardiología.
24 Como autores aparecerán el Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez (investigador
25 principal), Dr. Héctor David Rodríguez Flores (co-investigador) y el Dr. Carlos Jerjes
26 Sánchez Díaz (co-investigador).
27
28
29
30
31
32

33 Organización

35 Recursos humanos

38 Nombre del personal	39 Cargo	40 Funciones del personal	41 Tiempo de actividad
42 Dr. Jesús Manuel 43 Yáñez Sánchez	44 Cardiólogo pediatra 45 ICMV - CMZH	46 Análisis de 47 resultados, firma del 48 consentimiento 49 informado. 50 Explicación de 51 pormenores del 52 estudio.	53 3 años
54 Dr. Héctor David	55 Médico Pasante en	56 Recolección de	57 3 años

58 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 16
59 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
60 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Rodríguez Flores	Servicio Social del Tec de Monterrey	muestras, análisis de resultados, firma del consentimiento informado. Explicación de pormenores del estudio.
Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz	Director de Investigación Clínica del ICMV - CMZH	Asesoramiento en la investigación. 3 años

Recursos materiales

Materiales

- Kit de extracción de sangre: Lavander top. Invert 8 – 10x. Spray – dried potassium EDTA.
- Gradilla para colocación de tubos de muestras.
- Hielera.
- Geles de congelación.
- RayBio® sandwich ELISA kit ELH-BNP-001. RayBiotech Inc.

Aparatos

- Lector Multi-modal de Microplacas Synergy HT™ - **BioTek Instruments™**.
- Centrifuga Allegra 25R™ **Beckman Coulter Inc.**

Capacitación del personal

El Dr. Héctor David Rodríguez Flores cuenta con la capacitación requerida para la recolección y procesamiento de las muestras de sangre del cordón umbilical.

Financiamiento

Origen del material

Los recursos a utilizar son otorgados por la Cátedra de Cardiología del Instituto de Cardiología y Medicina Vascular del Centro Médico Zambrano Hellion. Participar en el estudio no genera ningún costo al paciente.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

Bibliografía

- 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
1.- Vijlbrief, D. B. (2012). Use of biomarkers in neonatology. *Pediatric Research*, 337-343.
2.- Law YM, Hoyer AW, Reller MD, Silberbach M (2009). Accuracy of plasma B-type natriuretic peptide to diagnose significant cardiovascular disease in children. *J Am Coll Carol* 54:1467-1475.
3.- Smith, J. Goetze, JP, Andersen CB, Vejlstrup N (2010). Practical application of natriuretic peptides in paediatric cardiology. *Carol Young* 20:352-363.
4.- Koch, A. Zink, S. Singer, H. (2006) B-type natriuretic peptide in paediatric patients with congenital heart disease. *European Heart Journal* 27: 861-866.
5.- Yáñez, J. Rodriguez, D. Treviño, C. Valdez, A. Sánchez, CJ. (2013). Stress Transient Hypertrophic Cardiomyopathy and B-Type Natriuretic Peptide Role. *Pediatric Cardiology* 34:702-706. Springer.
6.- CLSI. *Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition*. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
7.- Katayev Alex, C. B. (2010). Establishing Reference Intervals for Clinical Laboratory Test Results. Is There a Better Way? *Clinical Chemistry* .
8.- Lab Medicine. (2009). Determining Laboratory Reference Intervals: CLSI Guideline Makes the Task Manageable. *ASCP Lab Medicine* , 40 (2), 75-76.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2
3
4
5
6
7
Anexos

8
9
10 **Formato de historia clínica EBNPRNS01**

11
12 **Historia clínica del recién nacido. EBNPRNS01**

13 Fecha: Número participante:

14 Nombre de la madre:

15 Nombre del padre:

16 **Madre**

17 Edad: Tipo de sangre: G ___ P ___ C ___ A ___ VDRL/RPR

18 Comorbilidades:

19 **Embarazo**

20 Lugar y número de consultas del control prenatal:

21 Complicaciones durante el embarazo:

22 Medicamentos utilizados durante el embarazo:

23 **Labor y parto**

24 Trabajo de parto espontáneo o inducido:

25 Complicaciones del trabajo de parto:

26 Monitoreo fetal:

27 Ruptura de membranas: espontáneo o artificial.

28 Tiempo previo al parto:

Características:

29 Medicamentos, incluidos analgesia y anestesia.

30 Tiempo previo a parto.

31 Duración de fases de trabajo de parto.

32 Vaginal o cesárea.

33 APGAR 0/5.

34 Maniobras de resucitación.

35 **Recién nacido**

36 Peso al nacer: Edad gestacional:

37 Crecimiento intrauterino:

Género:

38 Fecha y hora del nacimiento:

39 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
40 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2 Signos vitales.
3
4

- 5 • Temperatura:
- 6 • Frecuencia cardiaca:
- 7 • Frecuencia respiratoria:
- 8 • Glucosa capilar:
- 9 • Problemas: Cianosis, dificultad respiratoria.

10
11 Edad gestacional estimada por Ballard.
12
13

- 14 • Física:
15 • Neuromuscular:
16
-

17
18
19
20
21
22
23
24 Nombre y firma de quien elaboró cuestionario
25

26
27
28
29
30
31 Formato resultado PNC EBNPRNS01
32

33 Resultado de PNC. EBNPRNS01
34

35
36 Fecha:
37

38 Número de participante:
39

40 PNC (0):
41

42
43 Lugar de procesamiento de la muestra
44

45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 20
58 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
59 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
60

1
2
3 **Consentimiento informado para los padres**
4
5

6 **CONSENTIMIENTO INFORMADO**
7

8 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano”
9

10
11 **Nombre de los investigadores:**
12

13 Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
14 Dr. Héctor David Rodríguez Flores.
15 Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz.

16
17 **Dirección del sitio de investigación:**
18

19 Centro Médico Zambrano Hellion. Batallón de San Patricio No. 112, Colonia
20 Residencial San Agustín. CP 66278. San Pedro Garza García. N. L., México.

21 Número de teléfono durante el día: 88-88-05-00.
22

23 Número de teléfono 24 Horas: 8183668143 – 8117805441.
24

25
26 **Introducción**
27

28 A través de este documento queremos hacerle una invitación a participar
29 voluntariamente en un estudio de investigación clínica, el cual tiene como objetivo
30 principal:
31

32 Definir, establecer y verificar los valores del PNC del recién nacido en un sector de la
33 población mexicana del estado de Nuevo León. Con la finalidad de determinar la
34 utilidad clínica de este biomarcador en el paciente neonatal.

35 Antes de que usted acepte la participación de su hijo(a) en este estudio, se le
36 presenta este documento de nombre “Consentimiento Informado”, que tiene como
37 objetivo comunicarle de los posibles riesgos y beneficios para que usted pueda
38 tomar una decisión informada.
39

40 El consentimiento informado le proporciona información sobre el estudio al que se
41 le está invitando a participar, por ello es de suma importancia que lo lea
42 cuidadosamente antes de tomar alguna decisión y si usted lo desea, puede
43 comentarlo con quien desee (un amigo, un familiar de confianza, etc.) Si usted tiene
44 preguntas puede hacerlas directamente a su médico tratante o al personal del
45 estudio quienes le ayudarán a resolver cualquier inquietud.
46

47 Una vez que tenga conocimiento sobre el estudio y los procedimientos que se
48 llevarán a cabo, se le pedirá que firme este documento para poder participar en el
49 estudio. Su decisión es **voluntaria**, lo que significa que **usted es totalmente libre de**
50 **ingresar o no en el estudio.** Podrá retirar su consentimiento en cualquier momento
51 y sin tener que explicar las razones, sin que esto signifique una disminución en la
52 calidad de la atención médica que se le proveerá , ni deteriorará la relación con su
53 médico tratante.
54

55 Protocolo EBNPRNS01 “Estandarización del péptido natriurético cerebral en 21
56 el recién nacido sano”. Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
57 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
58

Propósito del Estudio

El uso de biomarcadores representan una herramienta en el abordaje clínico de diversas patologías. La determinación de PNC es utilizada como herramienta para el diagnóstico y pronóstico en el adulto. Sin embargo, en pediatría aún no se logran determinar los valores de referencia de este biomarcador, por lo tanto, aún no está bien definida la utilidad clínica del mismo.

Por lo tanto, este protocolo busca definir, establecer y verificar dichos valores mediante la toma de muestras de sangre del cordón umbilical.

¿Cuántos pacientes participaran en el estudio?

146 pacientes que cumplan con los criterios de inclusión.

¿Cuánto durará su participación?

Durante su estancia intrahospitalaria.

¿Qué sucederá durante el estudio de Investigación?

Después de firmar el consentimiento informado se verificará que su hijo(a) cumpla con los siguientes **criterios de Inclusión**:

- Hijos e hijas de madres aparentemente sanas de entre 15 y 36 años de edad sin diabetes ni patologías asociadas al embarazo.
- Control prenatal adecuado: 5 consultas mínimo (OMS).
- Edad gestacional a término: (38-42 sdg).

Y que no presente ningún **criterio de exclusión**:

- Hijos e hijas de madres con patología previamente conocida.
- Hijos e hijas con cromosomopatía detectada durante el control prenatal.

Los siguientes son **criterios de suspensión** del estudio:

- Detección durante el estudio de alguno de los criterios de exclusión.
- Decisión de los padres de abandonar el estudio.

Procedimientos del Estudio

La recolección de muestra se realizará al momento del nacimiento, mediante la toma de una muestra de sangre del cordón umbilical, previo a ser cortado, independientemente de la vía de nacimiento (parto o cesárea).

Todas las recolecciones se llevarán a cabo previo al ingreso al área de cuneros.

Responsabilidades del Paciente

Proporcionar información acerca de su salud durante el estudio, especialmente cualquier evento adverso/cambios benéficos y en relación a su embarazo.

Reportar todos los síntomas independientemente de que estén relacionados o no con el estudio.

Reportar cualquier medicamento agregado o cambios a sus medicamentos prescritos.

Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey, N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.

1
2 Seguir las instrucciones del investigador respecto al medicamento y procedimientos
3 del estudio
4
5
6
7
8
9

Riesgos

10 **No existen riesgos para la madre o el recién nacido ya que la toma de muestras se**
11 **realizará directamente del cordón umbilical.**

12 **Beneficios**

13 El presente estudio **no representa ningún beneficio clínico para el paciente o sus**
14 **familiares.** Sin embargo, su participación es indispensable para el desarrollo del
15 estudio de biomarcadores, los cuales serán de gran utilidad para las generaciones
16 futuras.
17
18

19 **¿Qué opciones están disponibles aparte de participar en este estudio?**

20 Ninguna.
21
22

23 **Compensación por lesiones**

24 No existe posibilidad alguna de sufrir alguna lesión ya que las muestras de sangre
25 serán obtenida del cordón umbilical del recién nacido.
26

27 De ninguna manera el firmar esta forma de consentimiento anula sus derechos
28 legales ni libera a los investigadores, patrocinador o instituciones participantes de su
29 responsabilidad legal y profesional.
30
31

32 **¿Participar en el estudio es voluntario?**

33 Sí. Participar en este estudio de investigación es su decisión. Usted puede decidir no
34 participar o cambiar de opinión y después retirarse (abandonar). No habrá ninguna
35 penalidad y usted no perderá ningún beneficio que reciba ahora o que tenga
36 derecho a recibir.
37
38

39 Le diremos si contamos con información que pueda hacerlo cambiar de opinión
40 acerca de su participación en este estudio de investigación. Si usted desea
41 abandonarlo, deberá comentarlo directamente con el equipo de investigación.
42 Nos aseguraremos de que usted pueda terminar el estudio de la manera más segura.
43 En caso de ser necesaria, usted recibirá la atención de seguimiento adecuada.
44
45

46 El equipo de investigadores o el patrocinador del estudio pueden decidir retirarlo del
47 estudio sin su consentimiento si:

- 48
- 49 • **Usted no sigue las instrucciones de forma correcta.**
 - 50 • **El equipo de investigadores decide que el estudio no es lo mejor para usted.**
 - 51 • **El estudio es interrumpido por el patrocinador del estudio, el Consejo de**
52 **Revisión Institucional (CRI) o el Comité de Ética Independiente (CEI); grupo**
53 **de profesionales en el área que revisan la investigación para proteger sus**
54 **derechos, o por una agencia regulatoria.**

55
56 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 23
57 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
58 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
59
60

1
2
Costo de la participación

3
4
5
6
7
No habrá ningún costo por su participación en este estudio. El material en estudio,
8
9
10 los procedimientos relacionados con el estudio y las visitas del estudio serán
11 proporcionados sin ningún costo para usted o su compañía de seguros.
12
13

14 Usted será responsable por el costo de su atención médica habitual, incluidos los
15 procedimientos y/o medicamentos no relacionados con el estudio que el equipo de
16 investigadores o su médico tratante requieran durante el estudio como parte de su
17 atención médica habitual.
18
19

20 **¿Me pagarán por participar en este estudio?**
21
No recibirá ningún pago por participar en este estudio.

22 **Si participo en este protocolo de investigación, ¿Cómo se protegerá mi privacidad?**

23 **Confidencialidad**

24 Con su consentimiento, su médico tratante será informado que usted decidió
25 participar en este estudio de investigación.
26
27

28 Sus registros obtenidos mientras usted participa en este estudio, así como los
29 registros de salud relacionados, permanecerán estrictamente confidenciales en todo
30 momento. Sin embargo, tendrán que estar disponibles para, los miembros del
31 Comité de Ética Independiente y las autoridades médicas regulatorias.
32
33

34 Al firmar este consentimiento, usted otorga permiso para el estudio actual y
35 cualquier investigación posterior que pueda llevarse a cabo utilizando esta
36 información. Sin embargo, el equipo de investigadores tomará las medidas
37 necesarias para proteger su información personal, y no incluirá su nombre en ningún
38 formato, publicaciones o divulgación futura. Si se retira del estudio, no obtendremos
39 más información personal acerca de usted, pero podremos continuar utilizando la
40 información ya recopilada.
41
42

43 **Usted no será identificado en ninguno de los reportes o publicaciones que resulten**
de este estudio.

44 **SUS DERECHOS NO SON AFECTADOS BAJO NINGUNA LEY DE PROTECCIÓN DE LA**
INFORMACIÓN.

45 **¿A quién podré contactar si tengo preguntas del estudio o acerca de mis derechos?**
46 Antes de que usted firme este documento, deberá preguntar acerca de cualquier
47 cosa que no haya entendido. El equipo de investigadores responderá sus preguntas
48 antes, durante y después del estudio. Si usted piensa que su pregunta no ha sido
49 contestada completamente o si no entiende la respuesta, por favor continúe
50 preguntando hasta que esté satisfecho.
51
52

53 Si tiene alguna preocupación o queja acerca de este estudio o sobre cómo se está
54 realizando, por favor no dude en discutir sus preocupaciones con los investigadores:
55
56

57 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 24
58 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
59 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez.
60

1
2
3 Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez
4 Dr. Héctor David Rodríguez Flores
5 Dr. Carlos Jerjes Sánchez Díaz
6
7
8
9

10
11 No firme este formato a menos que usted haya tenido la oportunidad de hacer
12 preguntas y de que haya obtenido respuestas satisfactorias a todas sus preguntas.
13
14

15 Este Consentimiento ha sido revisado por las Comisiones de Ética e Investigación de
16 la Fundación Santos y de la Garza Evia I.B.P. (Hospital San José) y de la Escuela de
17 Medicina Tecnológico de Monterrey.
18
19

20 **Si usted tiene alguna pregunta con respecto a sus derechos como un paciente de**
21 **investigación, usted puede comunicarse al (01) 81 8888210.**
22
23

FIRMAS

24 Marcar con una X si se cumplió con lo que se menciona.
25
26

- 27 He sido informado acerca del estudio y tuve mi primer diálogo con el médico del
28 estudio o el personal de la investigación acerca de dicha información el (Fecha)
29 _____ a la hora (si es necesario) _____. (La hora es necesaria
30 solamente si la información y el consentimiento fueron entregados el mismo día.)
31 He leído y entendido la información en este documento de consentimiento
32 informado.
33 He tenido la oportunidad de hacer preguntas y todas mis preguntas fueron
34 contestadas a mi satisfacción.
35 Consiento voluntariamente la participación de mi hijo(a) en este estudio. No
36 renuncio a ninguno de mis derechos legales al firmar este documento de
37 consentimiento.
38
39

40 **Entiendo que recibiré una copia firmada y fechada de este documento, que tiene #**
41 **páginas.**
42
43

44 Nombre del familiar del participante:
45
46

47 Firma del familiar del participante:
48

49 Fecha de la firma:
50
51

52 **Nombre del representante legalmente autorizado:**
53 Parentesco:
54

55 Firma del representante:
56

57 Fecha de la firma:
58
59

60 **Testigos Imparciales**

61 Nombre del Testigo Imparcial 1:
62

63 Dirección del Testigo Imparcial 1:
64

65 Parentesco:
66

67 Protocolo EBNPRNS01 "Estandarización del péptido natriurético cerebral en 25
68 el recién nacido sano". Versión 1.2. fechado 19 de Mayo de 2014. Monterrey,
69 N.L. Méx. Dr. Jesús Manuel Yáñez Sánchez
70 For peer review only. <http://bmjopen.bmjjournals.com/site/about/guidelines.xhtml>

1
2 Firma del Testigo Imparcial 1:
3 Fecha:
4
5
6
7
8

9 Nombre del Testigo Imparcial 2:
10 Dirección del Testigo Imparcial 2:
11 Parentesco:
12 Firma del Testigo Imparcial 2:
13 Fecha:
14
15
16

17 **Persona que Obtiene el Consentimiento**

18
19
20

21 Nombre de la persona que condujo el proceso del consentimiento:
22 Firma:
23 Fecha de la firma:
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 * †El investigador o una persona adecuadamente calificada y capacitada designada
35 por el equipo de investigadores para dirigir el proceso de consentimiento informado
36 debe firmar y fechar la forma al mismo tiempo que el sujeto.
37

38 ‡Testigo imparcial: Una persona que es independiente al estudio, que no puede ser
39 influida injustamente por las personas involucradas con el estudio, que está
40 presente en el proceso de consentimiento informado si el sujeto o el representante
41 legalmente aceptable del sujeto no puede leer y que lee el consentimiento
42 informado y cualquier otra información escrita proporcionada al sujeto.
43 Guía E6 de Buenas Prácticas Clínicas para la Industria: Guía consolidada.
44

1
2
3
4 **STROBE 2007 (v4) Statement—Checklist of items that should be included in reports of cohort studies**
5

6 Section/Topic	7 Item #	8 Recommendation	9 Reported on page #
10 Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	2
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	2
Introduction			
13 Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	4
14 Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	4
Methods			
17 Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	4-5
18 Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	4-5
21 Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up	5
		(b) For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed	NA
24 Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	5-6
27 Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	5-6
29 Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	4-5
31 Study size	10	Explain how the study size was arrived at	6
32 Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	6
34 Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	6
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	6
		(c) Explain how missing data were addressed	7
		(d) If applicable, explain how loss to follow-up was addressed	NA
		(e) Describe any sensitivity analyses	NA
Results			7

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram	7 5
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest (c) Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	7 NA
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures over time	5
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	7 7
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	8
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	9
Limitations			
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	12-13
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	13
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	3

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

BMJ Open

B-type natriuretic peptide reference interval of newborns from healthy and preeclamptic women: a prospective, multicenter, cross-sectional study

Journal:	<i>BMJ Open</i>
Manuscript ID	bmjopen-2018-022562.R3
Article Type:	Research
Date Submitted by the Author:	28-Jul-2018
Complete List of Authors:	Rodriguez, David; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Clinical Research; Instituto de Cardiologia y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Garcia-Rivas, Gerardo; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Laresgoiti-Servitje, Estibalitz; Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Ciencias Clinicas Yañez, Jesus; Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Torre-Amione, Guillermo; Instituto de Cardiologia y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey Jerjes-Sanchez, Carlos; Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey; Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de Monterrey, Clinical Research
Primary Subject Heading:	Paediatrics
Secondary Subject Heading:	Cardiovascular medicine
Keywords:	Biomarkers, BNP, reference interval, newborn, preeclampsia

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **B-type natriuretic peptide reference interval of newborns from healthy and preeclamptic**
4 **women: a prospective, multicenter, cross-sectional study**
5
6
7
8

9 David Rodriguez^{a,b}, Gerardo Garcia-Rivas^a, Estibalitz Laresgoiti-Servitje^c, Jesus Yañez^b, Guillermo
10 Torre-Amione^{a, b, d}, Carlos Jerjes-Sanchez^{a,b*}.
11
12
13

14 ^a*Centro de Investigacion Biomedica del Hospital Zambrano Hellion, TecSalud, Escuela de
15 Medicina, Tecnologico de Monterrey, Mexico.*
16
17

18 ^b*Instituto de Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud, Escuela de Medicina y Ciencias de la
19 Salud, Tecnologico de Monterrey, Mexico.*
20
21

22 ^c*Ciencias Médicas Clínicas, Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnologico de
23 Monterrey, Mexico.*
24
25

26 ^d*Methodist DeBakey Heart and Vascular Center, The Methodist Hospital, USA.*
27
28
29

30 **ORCID ID:**

- 31 • David Rodriguez: <https://orcid.org/0000-0002-0811-4235>
32 • Gerardo Garcia-Rivas: <https://orcid.org/0000-0003-4731-3293>
33 • Estibalitz Laresgoiti-Servitje: <https://orcid.org/0000-0002-3271-9955>
34 • Carlos Jerjes-Sanchez: <https://orcid.org/0000-0003-3222-7405>
35
36
37

38 ***Corresponding author:** Carlos Jerjes-Sanchez, Director of Clinical Research, Instituto de
39 Cardiología y Medicina Vascular, TecSalud. Centro Medico Zambrano Hellion. Batallón San Patricio
40 112, Real de San Agustin, 66278 San Pedro Garza García, Nuevo Leon. México. Email:
41 jerjes@prodigy.net.mx, carlos.jerjes@udicem.org Telephone: +5281-88880000.
42
43

44 **Keywords:** Biomarkers; BNP; reference interval; newborn; preeclampsia
45
46

47 **Word count:** 3113.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Objective: To define and compare the reference interval of BNP in healthy newborns from healthy mothers and with severe preeclampsia.

Design: Prospective, multicenter, cross-sectional study.

Setting: Four obstetric wards of second-level academic hospitals.

Participants: 167 healthy newborns, from 146 healthy and 21 severe preeclamptic women. We included newborns from healthy mothers with full-term pregnancies (38 to 42 gestational weeks), who received adequate prenatal care, and who had Apgar scores ≥ 7 at 0 and 5 minutes. Newborns with chromosomopathies identified during prenatal consultations, those with respiratory distress, and those with cardiac or pulmonary disease detected in the first pediatric evaluation were excluded from this study. In the group of preeclamptic women, we considered the same inclusion criteria, but the patients also had to meet the diagnostic criteria for preeclampsia with severity features, according to the ACOG guidelines. The same exclusion criteria used for the healthy group was applied to the preeclampsia-associated newborn.

Interventions: A single blood sample from the umbilical cord artery after delivery (vaginal or cesarean section).

Primary outcome: Reference level of BNP in healthy newborns.

Results: In the healthy newborns group, the median BNP was 12.15 pg/mL (IQR 7.7 – 16.8 pg/mL) and in the preeclamptic group 20.8 pg/mL (IQR 5.8 – 46.5 pg/mL). The reference interval for BNP in healthy newborns was 5 (95% CI 5-5) - 34 pg/mL (95% CI 28.4-38.8). We identified higher expression of BNP in newborns from preeclamptic women overall ($p=0.037$, $r = 0.16$) and in newborns exposed to stress conditions, such as complications during labor and delivery ($p=0.004$, $r = 0.33$).

Conclusions: In healthy newborns, BNP concentrations at birth were lower than reported in other similar populations. In neonates with stress conditions, the higher expression of this biomarker establishes another possible link between stress and the cardiovascular response.

Trial registration: ClinicalTrials.gov: NCT02574806.

Article summary

Strengths and limitations of this study

- First prospective multicenter cohort study aimed to determine the reference interval of BNP in the healthy newborn after delivery.
- Study population, sample size, and statistical analysis were defined according to the guidelines from the Clinical & Laboratory Standards Institute.
- There were no serial measurements of BNP for follow-up.
- The study is limited only to BNP, due to its relevance as a marker of ventricular dysfunction.
- No imaging tools were used for structural and functional assessment.

Funding statement: This study was supported by Endowed Chair in Cardiology (Tecnológico de Monterrey, 0020CAT131); CONACYT (Grant 151136, 133591, 269399) and Xignus Research Fund.

Disclosure of interest: None declared.

Authors contribution: D.R. contributed to the design and implementation of the protocol, the analysis of the results, and the writing of the manuscript. G.GR contributed to the analysis of the results and the writing of the manuscript. E.LS. contributed to the analysis of the results and the writing of the manuscript. J.Y. contributed to the design of the protocol, the analysis of the results, and the writing of the manuscript. G.TA. contributed to the design of the protocol, the analysis of the results, and writing the manuscript. C.JS contributed to the design and implementation of the protocol, the analysis of the results and the writing of the manuscript.

Data sharing statement: The authors do not have permission to share data since our informed consent form did not inquire for permission to share data.

Introduction

Several studies have proved the B-type natriuretic peptide (BNP) as a promising diagnostic and stratification biomarker in multiple clinical settings concerning the adult population [1]. In pediatric patients with cardiac disorders, BNP is an essential tool for diagnosis, risk stratification, and prognosis [2]. Since elevated expression of BNP in the pediatric population has been associated with poor ventricular function and outcomes as seen in patent ductus arteriosus, persistent pulmonary hypertension of the newborn, and stress transient cardiomyopathy [3,4]. However, newborns have peak levels in the first days of life, which decrease within the first week and vary greatly [5]. The published normal range of BNP and the amino-terminal segment of its prohormone (NT-pro-BNP) appear to have an age- and gender-dependent trend [6]. The ample range of blood concentrations of both biomarkers can be attributed to several perinatal factors that may be influencing myocardial performance during the postnatal transition period [5,7–10]. Despite aforementioned data [3,4], perhaps BNP, is not the best option as a biomarker in neonates [6]. On the other hand, in newborns with acute respiratory distress, a normal BNP value may have a high negative predictive value for ruling out ventricular dysfunction from other acute disorders (i.e., respiratory distress, sepsis, or metabolic alterations), improving the quality of medical care. Additionally, preeclampsia is a vascular disorder that increases maternal and fetal/neonatal morbidity and mortality [11], increases BNP expression [12] and has deleterious effects on the cardiovascular system of the newborn [13]. Whether these maternal mechanisms influence the expression of BNP in the newborn is an unmet question. Currently, BNP concentration has an impact in early disease stratification. Nonetheless, its role and the normal concentrations in the healthy neonatal population has not been elucidated. Also, the influence of maternal preeclampsia on the cardiovascular system of the newborn is not well known. Therefore, we conducted the first prospective, multicenter, cross-sectional study to establish the reference interval of BNP in healthy newborns (HN), and thereafter compared BNP concentrations between newborns of healthy and preeclamptic mothers.

Methods

Study design

A multicenter, prospective, cross-sectional study was designed to establish the reference interval of BNP in HN at birth and to compare it with those in offspring of preeclamptic mothers. The study was conducted at the obstetrics wards of four academic-hospitals, during the period from April 2014 to April 2015. Medical health records were reviewed to assess the potential eligibility of each participant, and a direct interview confirmed that all inclusion criteria were met. Inclusion criteria: 1) newborns from healthy mothers with full-term pregnancies (38 to 42 gestational weeks), 2) who received adequate prenatal care, and 3) who had Apgar scores ≥ 7 at 0 and 5 minutes. Exclusion criteria 1) newborns with chromosomopathies identified during prenatal consultations, 2) those with respiratory distress, and 3) those with cardiac or pulmonary disease detected in the first pediatric evaluation. In the group of preeclamptic women, we considered the same inclusion criteria, but the patients also had to meet the diagnostic criteria for preeclampsia with severity features, according to the American College of Obstetricians and Gynecologists (ACOG) guidelines. The same exclusion criteria used for the HN group was applied to the preeclampsia-associated newborn (PAN) group (Figure 1).

We collected a single whole blood sample from the umbilical cord artery after delivery (vaginal or cesarean section) in 4 mL spray-coated K2EDTA tubes (BD Vacutainer®), which was immediately processed and analyzed eliminating need for storage. Arterial blood was preferred over venous blood because this would allow a direct measurement of BNP concentration from the bloodstream of the newborn. After determining the BNP reference interval in HN, this group was compared with newborns from mothers with severe preeclampsia. Anthropometry and clinical status were obtained from the records of attending pediatricians and neonatologists. All infants were evaluated in the nursery ward during the first hours of the neonatal period to ascertain their health status. Written informed consent was obtained from all mothers before newborns enrollment. This study was conducted according to the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Research

Committees of the Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey. The trial was registered in ClinicalTrials.gov: NCT02574806.

BNP measurement

BNP was measured by using the Triage® MeterPlus and Triage® BNP Test (Alere™). The Triage BNP assay is a rapid, point of care fluorescence immunoassay for the quantitative measurement of BNP in potassium ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA) anticoagulated whole blood or plasma specimens [14]. In brief, the sample reacts with fluorescent antibody conjugates and flows through the test device by capillary action. Complexes of fluorescent antibody conjugate are captured in a specific area for BNP. BNP concentration in the specimen is directly proportional to the fluorescence detected, and in approximately 15 minutes, a result is obtained. The measurement range of the BNP assay is 5 pg/mL to 5000 pg/mL. A measurement range > 100 pg/mL is determined as abnormal by the equipment referencing literature [14].

Study Definitions

A healthy mother was considered as a biological female between 15 and 36 years old, without chronic disease history or pregnancy-associated diseases. Adequate prenatal care was defined using the World Health Organization criterion, consisting of at least five obstetric office visits. Severe preeclampsia was diagnosed according to the ACOG criteria which consists of: the presence of preeclampsia with systemic involvement, including heart failure, visual or cerebral disturbances, thrombocytopenia, abnormal liver tests and/or renal failure [15]. Complicated delivery was defined as prolonged labor (≥ 14 hours), evidence of abnormal antenatal cardiotocographic records, no reassuring fetal status, amniotic fluid abnormalities (i.e., volume disturbances, meconium), aspiration of meconium during birth or umbilical cord compression.

Statistical analysis

The sample size was determined based on the guidelines from the Clinical and Laboratory Standards Institute, which establishes that the minimum sample of healthy reference subjects required to obtain a reference interval with a 95% CI is 146 subjects [16–18]. Continuous variables

were expressed as mean \pm standard deviation. Furthermore, categorical variables were expressed as numbers and percentages. All values are rounded to the nearest tenth decimal. Values of BNP were shown as median and interquartile range (IQR). The reference interval of BNP in HN was determined by estimation of the 2.5th and 97.5th percentile with 95% confidence interval (95%CI), by parametric or non-parametric methods depending on BNP values distribution, as recommended by Clinical and Laboratory Standards Institute [17]. For non-parametric continuous variables, we used Mann-Whitney U test to compare BNP expression between groups. Chi-square tests for association were conducted to evaluate percentage differences between categorical variables among newborns from HN and PAN groups. A probability of alpha-error < 0.05 was considered for significant results. Statistical analysis was performed using the Statistics Package for the Social Sciences (SPSS) from IBM Corporation, version 22, and Stata/IC 14.2 for Mac (College Station, TX). Graphs were made with Prism 7 for Mac OS X.

Patient involvement

No patients were involved in the planning of this research.

Results

From April 2014 to April 2015, 167 samples were collected in two hospitals from the public sector and two from the private sector; 146 newborns were categorized as the healthy group, and 21 as the preeclampsia group. The latter group was composed by newborns from mothers who developed preeclampsia during the third trimester of pregnancy, requiring admission to the obstetric intensive care unit (Table 1). Maternal population was younger, with all HN delivered at term, and high incidence of spontaneous labor and rupture of membranes (Table 1). Both the HN and PAN groups had similar proportions of nulliparous and multiparous mothers and small percentages of previous miscarriages or abortions. A high rate of newborn deliveries in HN and PAN groups were performed by cesarean section. We observed delivery complications in 15.8% and 33.3% neonates from the HN and PAN group, respectively. From the PAN group, 24% neonates presented cyanosis and 14.2% respiratory distress. There was no missing data.

A non-normal distribution of BNP values was found both study groups by visual histogram inspection and the Shapiro-Wilk test ($p<0.05$) (Figure 2). Therefore, we decided to follow a non-parametric analysis approach to determine the reference interval and assess group differences in BNP concentrations. In the healthy group, the BNP median was 12.15 pg/mL (IQR 7.7 – 16.8 pg/mL) and in the preeclamptic group 20.8 pg/mL (IQR 5.8 – 46.4 pg/mL). The reference interval of BNP in healthy newborns based on 2.5th and 97.5th percentiles was 5 (95% CI 5-5) - 34 pg/mL (95% CI 28.4-38.8) (Figure 3). Offspring from the PAN group had significantly higher BNP levels compared to those in the HN ($p = 0.037$), with a small effect size, $r = 0.16$. Almost one third of the PAN group (28.6%) were outside the reference range. Figure 3 shows BNP concentrations in HN and PAN groups. Additionally, subgroup analyses of HN group is shown in Table 2. Also, we described medians and IQR of BNP in the same table. Children from the HN group delivered by C-section had significantly higher ($p=0.18$) BNP values than those born by vaginal delivery, although with a small effect size, $r = 0.19$ (median 13.8 pg/ml, IQR 8.9-18.1 pg/mL vs 11.2 pg/mL, IQR 6.8-15.3 pg/mL, respectively). The Mann Whitney U test that evaluated BNP concentrations between newborns in the PAN group with and without delivery complications was also significant, in the expected direction ($p=0.038$), and with a moderate effect size, $r = 0.45$. Those babies with delivery complications had higher BNP values [median 47.9 pg/mL (IQR= 12.2-62.6 pg/mL)] compared to the ones with non-complicated deliveries [median 15.5 pg/mL (IQR= 5.0-25.4 pg/mL)]. Also, we identified that complicated deliveries in the PAN group had higher expression of BNP than those babies with complicated delivery in the HN group ($p=0.004$, $r=0.33$).

Lastly, chi-square tests for association were conducted to evaluate percentage differences in labor initiation, a method of membrane rupture, the use of analgesia during delivery, development of delivery complications, the presence of cyanosis or respiratory distress, and admission to the neonatal intensive care unit among newborns from HN and PAN groups. Analyses showed no significant association with spontaneous or induced labor initiation ($p = 0.209$), the method of membrane rupture ($p = 0.059$), use of analgesia during labor ($p = 0.75$), nor for the presence of

1
2
3 delivery complications ($p = 0.109$) with HN or PAN groups. However, significant association was
4 found between newborns born from preeclamptic mothers and the presence of cyanosis ($\chi^2(1)=$
5 3583, $p= 0.000$, Cramer's $V= 0.46$); the development of respiratory distress ($\chi^2(1)= 21.23$, $p= 0.000$,
6 Cramer's $V= 0.35$); and admission to neonatal intensive care unit ($\chi^2(1)= 21.23$, $p= 0.000$, Cramer's
7 $V= 0.35$).
8
9
10
11

12 Discussion

13

14

15 The results from this multicenter study provide three important observations regarding the use of
16 BNP concentrations in the pediatric population. Firstly, BNP concentrations were lower in healthy
17 offspring population at birth, compared to those observed in similar populations and lower than the
18 values detected in pediatric [7,19] and adult patients [12]. Secondly, higher BNP concentrations in
19 newborns with two stressors (i.e., preeclampsia and complicated delivery) contributes to elucidate
20 another link between stress and cardiac response [20]. Lastly, high peak levels of BNP
21 concentrations known to be present at birth, as a consequence of the physiological conditions of the
22 newborn, were not observed in our HN group.
23
24
25
26
27
28
29
30

31 BNP and the inactive NT-pro-BNP levels are reasonably correlated, and either of them can be used
32 in patient care. Although the usefulness of BNP concentrations in identifying different ventricular
33 dysfunction stages or mortality risks in the adult [21] and pediatric populations [4,7,19] has been
34 well established, studies in children are more challenging and remain limited than those in adults.
35 One of the most important factors promoting this limitation is the lack of normative biomarker values
36 in children [19]. Additionally, average adult BNP values vary depending on the assay method and
37 patient demographics; whereas appropriate reference values are lacking in children.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 Our results show that in HN at birth, BNP concentration was lower [median 12.15 pg/mL (IQR 7.7 –
50 16.8 pg/mL)] than that reported in other neonate populations [96 pg/mL (mean 134 ± 130 pg/mL)]
51 without disease [7]. Although, in this study, newborns included had signs and symptoms of a
52 cardiovascular disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
53 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
54 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
55 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
56 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
57 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
58 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
59 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular
60 disease requiring urgent pediatric cardiology consult, and most had a cardiovascular

1
2
3 illness with or without anatomic defect [7]. Most studies show high levels of BNP and NT-pro-BNP
4 immediately after birth, decreasing during the third or fourth day of life [22,23]. Other reports
5 indicate a tendency or significant decrease in BNP concentrations, suggesting that the peptide
6 levels are dependent on age, the assay used for its measurement, and possibly the gender [10].
7 Additionally, a BNP cut-off value of 170 pg/mL during the first 7 days of extrauterine life and value
8 of 41 pg/mL for those older than 7 days but younger than 19 years-old has been established [7].
9
10
11
12
13
14
15

16 In our results, BNP expression was independent of maternal characteristics including age, and
17 obstetric history. However, we did find increased BNP values in babies delivered by C-section, but
18 only in the HN group. This finding is in accordance with previous studies that have reported that
19 BNP expression was dependent on delivery method [22–24].
20
21
22
23
24
25

26 Even though the reason for higher NT-pro-BNP or BNP values soon after birth remains unknown,
27 several mechanisms have been considered, its role in the homeostasis, increased body water,
28 myocardium stiffness, etc. [7]. Moreover, newborns may be less responsive to natriuretic peptides,
29 so a higher secreted level may be required to promote the well-recognized natriuresis that
30 commences within the first week of life. During this time, the precipitous decrease in pulmonary
31 vascular resistance may also be promoted by natriuretic peptides [7]. On the other hand, our results
32 suggest that perinatal factors related to postnatal transition do not have any influence on myocardial
33 performance. Since current and strong evidences [25–27] support that BNP does not cross the
34 placental barrier, so these values only reflect the myocardial performance to extrauterine life.
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 The whole blood BNP concentrations (median 12.15 pg/mL, IQR 7.7 – 16.8 pg/mL) observed in our
46 HN population were similar to BNP levels throughout pregnancy in healthy women [12], suggesting
47 that a BNP concentration > 20 pg/mL in pregnant women and newborns may indicate ventricular
48 stress and/or subclinical cardiac dysfunction. Currently, in adult patients ventricular dysfunction is
49 unlikely when BNP concentrations are < 100 pg/mL. However, some studies have suggested that a
50 cut-off value of 50 pg/mL, rather than 100 pg/mL, will increase its sensitivity and negative predictive
51 value [28].
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 value in adult or pediatric populations [28]. The clinical implications of our findings suggest that in
4 newborns a reference interval of 5 (95% CI 5-5) - 34 pg/mL (95% CI 28.4-38.8) instead of < 100
5 pg/mL could increase its sensitivity and the negative predictive value reducing the proportion of
6 false positives. BNP expression superior to the obtained reference interval could be considered as
7 a gray zone of this biomarker, without clinical relevance in early phases. However, if this abnormal
8 expression could have further clinical implications is an unsolved question. It is possible that the
9 lower BNP concentrations observed in our study, as suggested by other observations
10 [3,7,10,29,30], may depend on racial or genetic characteristics. Recently, results support this
11 consideration based on higher BNP concentrations (32.02 ± 3.37 pg/mL, mean \pm SE) compared to
12 our HN population [31]. However, the mechanisms behind this finding remain as an unresolved
13 question.
14
15

16 Another relevant result was higher BNP concentrations in neonates under two stressors (maternal
17 preeclampsia and delivery complications), compared to HN (median 47.9, IQR 12.6 – 62.6 pg/mL,
18 vs 8.9, IQR 6.7 – 13.7 pg/mL, $p=0.004$, $r=0.33$) despite a good adaptation to extrauterine life. In the
19 short-term follow-up, we did not observe a clinical important difference, since BNP concentrations
20 were not associated with need for a specialist consultation, NICU transfer, death, or congenital
21 cardiac disease. Although the stress role in cardiovascular disorders has been well established [20],
22 its participation in other pediatric clinical models [21] is still uncertain. Since there is an embryologic
23 link between neurologic diseases and cardiomyopathy (common neuroectodermal origin),
24 catecholaminergic overexpression in neuroendocrine disease may elicit an abnormal response in
25 the myocardial adrenergic receptors. Thus, in early stages, if this overexpression is not sustained,
26 cellular disarray could induce higher BNP concentrations. In late stages, and under conditions of
27 continued stress, this mechanism could be linked to several models of transient hypertrophic
28 cardiomyopathy [21].
29
30

31 Lastly, although despite previous evidence establishing different BNP concentrations depending on
32 the type of delivery [22–24] and by the presence of preeclampsia [2], our results did not reproduce
33
34

1
2
3 these observations. Our study group only showed increased BNP concentrations in neonates who
4 were born by C-section from healthy mothers. Also, no differences among delivery type and BNP
5 concentrations were identified.
6
7

8
9
10 There are several potential limitations of our study. A major limitation was the lack of long-term
11 follow-up of the offspring, with pediatric visits and blood draws to establish serial measurements of
12 BNP which could help determine its prognostic value of BNP for cardiovascular conditions during
13 different stages of growth and development along with its relevance for chronic diseases. However,
14 our aim was only to focus on the assessment of BNP expression in the HN as a tool for clinical-
15 decision making in the compromised neonate. Additionally, maternal BNP concentrations were not
16 obtained, nor other biomarkers or imaging diagnostic tools were used. The influence of the
17 placenta on biomarker levels was not examined by this study, and the sample size of the newborns
18 from mothers with preeclampsia is small compared to the HN group (21 vs 146). Thus; the reader
19 should be cautious when interpreting our results since only large differences between the HN and
20 PAN groups will be statistically significant. However, we identified that stress conditions
21 (preeclampsia and complicated delivery) are triggers that increase BNP expression, but it will be
22 necessary to evaluate this finding in more extensive studies focused on a preeclamptic population.
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

Clinical implications

38
39 Newborns at birth with respiratory distress present an extra challenge to most physicians because
40 of a lack of a well-communicated history. Rapid evaluation is needed so that they can be referred
41 quickly to the correct physician (i.e., cardiologist or pulmonologist) to receive appropriate treatment.
42 If our results are reproduced, BNP concentrations could have a great future as a biomarker. In our
43 population, the upper limit of BNP expression in the HN is < 40 pg/mL, if this result is reproduced in
44 future studies, this value could be used to address the clinical suspicion about the etiology of the
45 acute respiratory distress shortening the time to diagnosis and undergo specialized treatment.
46
47
48
49
50
51
52
53
54

Conclusion

In healthy newborns, BNP concentration at birth was lower than previously reported in similar populations. Neonates under stress conditions related to complications at birth showed a higher expression of this biomarker, which elucidates a possible link between stress and the corresponding cardiovascular response in this population.

Acknowledgments: Thanks to *Werfen IL, Mexico* for providing equipment and supplies, as well as to the team of doctors and fellows of Gynecology and Obstetrics and Pediatrics of Programas Multicéntricos de Residencias Médicas, Tecnológico de Monterrey. Special thanks to Dr Flores-Tamez, for his support and giving us access to the facilities for the development of the study. To Dr Kristopher J. Currie G for editorial assistance.

References

- 1 Daniels LB, Maisel AS. Natriuretic peptides. *J Am Coll Cardiol* 2007;**50**:2357–68.
2 doi:10.1016/j.jacc.2007.09.021
- 3 Vijlbrief D. *Cardiac biomarkers in Neonatology*. Utrecht University 2015.
- 4 El-Khuffash A, Molloy EJ. Are B-type natriuretic peptide (BNP) and N-terminal-pro-BNP useful in neonates? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2007;**92**:F320–4. doi:10.1136/adc.2006.106039
- 5 Yañez J, Rodriguez D, Treviño C, et al. Stress transient hypertrophic cardiomyopathy and B-type natriuretic peptide role. *Pediatr Cardiol* 2013;**34**:702–6. doi:10.1007/s00246-012-0317-5
- 6 Koch A, Singer H. Normal values of B type natriuretic peptide in infants, children, and adolescents. *Heart Br Card Soc* 2003;**89**:875–8.
- 7 Ten Kate CA, Tibboel D, Kraemer US. B-type natriuretic peptide as a parameter for pulmonary hypertension in children. A systematic review. *Eur J Pediatr* 2015;**174**:1267–75. doi:10.1007/s00431-015-2619-0
- 8 Law YM, Hoyer AW, Reller MD, et al. Accuracy of plasma B-type natriuretic peptide to diagnose significant cardiovascular disease in children: the Better Not Pout Children! Study. *J Am Coll Cardiol* 2009;**54**:1467–75. doi:10.1016/j.jacc.2009.06.020
- 9 Smith J, Goetze JP, Andersen CB, et al. Practical application of natriuretic peptides in paediatric cardiology. *Cardiol Young* 2010;**20**:353–63. doi:10.1017/S1047951110000211
- 10 Koch A, Zink S, Singer H. B-type natriuretic peptide in paediatric patients with congenital heart disease. *Eur Heart J* 2006;**27**:861–6. doi:10.1093/eurheartj/ehi773
- 11 Nir A, Lindinger A, Rauh M, et al. NT-pro-B-type natriuretic peptide in infants and children: reference values based on combined data from four studies. *Pediatr Cardiol* 2009;**30**:3–8. doi:10.1007/s00246-008-9258-4
- 12 Backes CH, Markham K, Moorehead P, et al. Maternal Preeclampsia and Neonatal Outcomes. *J Pregnancy* 2011;**2011**:1–7. doi:10.1155/2011/214365
- 13 Resnik JL, Hong C, Resnik R, et al. Evaluation of B-type natriuretic peptide (BNP) levels in normal and preeclamptic women. *Am J Obstet Gynecol* 2005;**193**:450–4. doi:10.1016/j.ajog.2004.12.006
- 14 Hakim J, Senterman MK, Hakim AM. Preeclampsia Is a Biomarker for Vascular Disease in Both Mother and Child: The Need for a Medical Alert System. *Int J Pediatr* 2013;**2013**:1–8. doi:10.1155/2013/953150
- 15 Inverness Medical. Triage BNP product insert. 2009. <http://www.alere.com/en/home/product-details/triage-bnp-test.html>
- 16 Chaiworapongsa T, Chaemsathong P, Yeo L, et al. Pre-eclampsia part 1: current understanding of its pathophysiology. *Nat Rev Nephrol* 2014;**10**:466–80. doi:10.1038/nrneph.2014.102
- 17 Determining Laboratory Reference Intervals: CLSI Guideline Makes the Task Manageable. *Lab Med* 2009;**40**:75–6. doi:10.1309/LMEHV3HP39QOFJPA

- 1
2
3 17 Horowitz GL, Clinical and Laboratory Standards Institute. *Defining, establishing, and verifying*
4 *reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*. 2010.
5
6 18 Katayev A, Balciza C, Seccombe DW. Establishing reference intervals for clinical laboratory
7 test results: is there a better way? *Am J Clin Pathol* 2010;133:180–6.
8 doi:10.1309/AJCPN5BMTSF1CDYP
9
10 19 Bernus A, Wagner BD, Accurso F, et al. Brain Natriuretic Peptide Levels in Managing Pediatric
11 Patients With Pulmonary Arterial Hypertension. *Chest* 2009;135:745–51. doi:10.1378/chest.08-
12 0187
13
14 20 Black PH, Garbutt LD. Stress, inflammation and cardiovascular disease. *J Psychosom Res*
15 2002;52:1–23.
16
17 21 Jerjes-Sanchez C, Garcia N, Leon-Gonzalez ED de, et al. Significance of Biomarker Panel
18 Including Cardiac Troponin I, D-dimer, and B-Type Natriuretic Peptide in Acute Aortic
19 Dissection. *J Cardiol Ther Published Online First*: 2013. doi:10.12970/2311-052X.2013.01.02.4
20
21 22 Gemelli M, Mamì C, Manganaro R, et al. Effects of the mode of delivery on ANP and renin-
22 aldosterone system in the fetus and the neonate. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*
23 1992;43:181–4.
24
25 23 Seong WJ, Yoon DH, Chong GO, et al. Umbilical cord blood amino-terminal pro-brain
26 natriuretic peptide levels according to the mode of delivery. *Arch Gynecol Obstet*
27 2010;281:907–12. doi:10.1007/s00404-009-1253-3
28
29 24 Fortunato G, Carandente Giarrusso P, Martinelli P, et al. Cardiac troponin T and amino-terminal
30 pro-natriuretic peptide concentrations in fetuses in the second trimester and in healthy
31 neonates. *Clin Chem Lab Med* 2006;44:834–6. doi:10.1515/CCLM.2006.144
32
33 25 Mulay S, Varma DR. Placental barrier to atrial natriuretic peptide in rats. *Can J Physiol
34 Pharmacol* 1989;67:1–4.
35
36 26 Bakker J. Reference Values for N-Terminal Pro-B-Type Natriuretic Peptide in Umbilical Cord
37 Blood. *Clin Chem* 2004;50:2465–2465. doi:10.1373/clinchem.2004.040253
38
39 27 Zhu R, Nie Z. A Clinical Study of the N-Terminal pro-Brain Natriuretic Peptide in Myocardial
40 Injury after Neonatal Asphyxia. *Pediatr Neonatol* 2016;57:133–9.
41 doi:10.1016/j.pedneo.2015.08.001
42
43 28 Omar HR. Acute cardiogenic pulmonary edema with normal BNP: the value of repeat BNP
44 testing. *Am J Emerg Med* 2015;33:605.e5-605.e6. doi:10.1016/j.ajem.2014.10.006
45
46 29 Mir TS, Laux R, Hellwege HH, et al. Plasma concentrations of aminoterminal pro atrial
47 natriuretic peptide and aminoterminal pro brain natriuretic peptide in healthy neonates: marked
48 and rapid increase after birth. *Pediatrics* 2003;112:896–9.
49
50 30 Mannarino S, Garofoli F, Mongini E, et al. BNP concentrations and cardiovascular adaptation in
51 preterm and fullterm newborn infants. *Early Hum Dev* 2010;86:295–8.
52 doi:10.1016/j.earlhumdev.2010.04.003
53
54 31 Blohm ME, Arndt F, Sandig J, et al. Cardiovascular biomarkers in paired maternal and umbilical
55 cord blood samples at term and near term delivery. *Early Hum Dev* 2016;94:7–12.
56 doi:10.1016/j.earlhumdev.2016.01.001
57
58
59
60

Table 1. Demographic and clinical characteristics of healthy and preeclamptic mothers and newborns.

Characteristics	Healthy group, n=146 Median [Q1-Q3], No. (%)	Preeclamptic group, n=21 Median [Q1-Q3], No. (%)	p-value
Mothers			
Age (years)	23.5 [18 – 29]	21 [18 – 28]	0.48
Public sector	118 (80.8)	21 (100)	0.026
Gravidity >1	76 (52)	9 (43)	0.43
Abortion >1	4 (2.7)	1 (4.8)	0.61
Gestational age (weeks)	39.5 [38.5 – 40.2]	38.4 [37.2 – 40.2]	0.005
Spontaneous labour	76 (52)	14 (66.7)	0.20
Spontaneous ruptures of membranes	87 (59.6)	17 (81)	0.058
Epidural analgesia	141 (96.6)	20 (95.2)	0.75
Normal delivery	79 (54.1)	3 (14.3)	0.0007
Newborns			
Male	79 (54.1)	6 (28.6)	0.02
Apgar score at 0 minutes	8 [8 – 9]	8 [8 – 8]	0.014
Apgar score at 5 minutes	9 [9 – 9]	9 [9 – 9]	0.005
Weight (kg)	3.3 [3.0 – 3.5]	3 [2.7 – 3.3]	0.009
Estimated gestational age by Dubowitz score (weeks)	39.2 [38.4 – 40.1]	38.3 [37 – 39.6]	0.005
Complicated delivery	23 (15.8)	7 (33.3)	0.049
Cyanosis	0	5 (23.8)	0
Respiratory distress	0	3 (14.2)	0.0017

Tables

1	
2	
3	Nursery
4	146 (100)
5	18 (85.7)
6	0.0017
7	Neonatal intensive care unit
8	0
9	3 (14.2)
10	0.0017
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	
21	
22	
23	
24	
25	
26	
27	
28	
29	
30	
31	
32	
33	
34	
35	
36	
37	
38	
39	
40	
41	
42	
43	
44	
45	
46	
47	
48	
49	
50	
51	
52	
53	
54	
55	
56	
57	
58	
59	
60	

For peer review only

1
2 Table 2. Subgroup analysis of median B-type natriuretic peptide of HN and PAN groups.
3

	Healthy newborns		Preeclampsia-associated newborns
	BNP Median (Q1-Q3)	p-value	BNP Median (Q1-Q3)
Overall BNP	12.1 (7.7-16.8)	-	20.8 (5.8-46.4)
Sex			
Male	12.0 (7.5-16.9)	0.91	11.15 (5.0-49.5)
Female	12.2 (8.4-16.0)		22.3 (9.9-45.1)
Delivery			
Spontaneous	11.8 (7.7-16.0)	0.56	21.5 (11.6-36.4)
Induced labor	12.5 (8.3-17.4)		6.3 (5.0-57.6)
Analgesia			
Epidural analgesia	11.8 (7.7-16.6)	0.08	18.4 (5.5-41.9)
Non-analgesia	14.3 (12.7-27.7)		54.5 (54.5-54.5)
Delivery method			
Vaginal delivery	11.2 (6.8-15.3)	0.01	32.6 (15.1-32.6)
C-section	13.8 (8.9-18.1)		18.4 (5.2-45.7)

Membrane rupture			
Spontaneous	11.7 (7.2-15.8)	0.05	20.8 (8.1-38.8)
Artificial rupture of membranes	13.8 (8.7-19.2)		31.3 (5.0-61.3)
Complications			
Delivery complications	8.9 (6.7-13.7)	0.11	47.9 (12.2-62.6)
Normal delivery	12.3 (8.3-16.8)		15.5 (5.0-25.4)

The overall BNP row describes the comparison of the median BNP measurement of the HN. Also, the median and IQR range of BNP from PAN group.

1
2
3 **Figure captions**
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- **Figure 1.** Flow diagram of study and BNP values.
- **Figure 2.** Shows the distribution of the BNP values in HN group. The right-skewed distribution was related to the limit of quantification of the equipment (5 pg/mL). Thus, a logarithmic transformation was performed. However, the distribution remains right-side skewed. Consequently, the reference interval was estimated using the rank-based method for non-parametric distribution.
- **Figure 3.** Box plot of reference interval of BNP values in HN and PAN group (whiskers represent 2.5th and 97.5th percentiles).

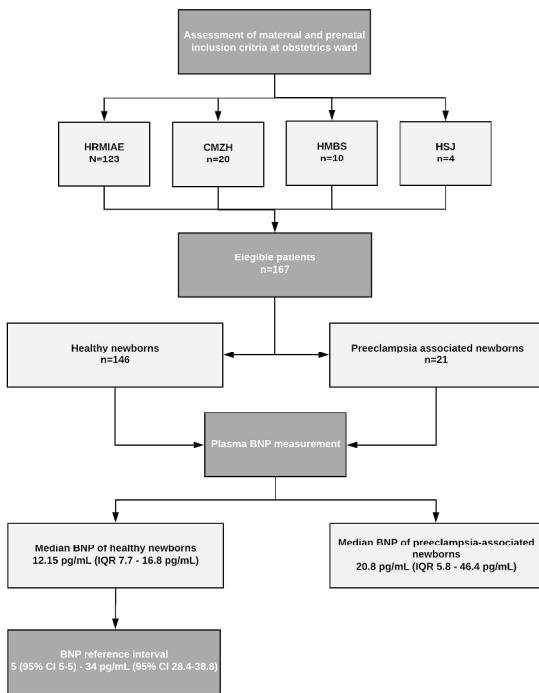
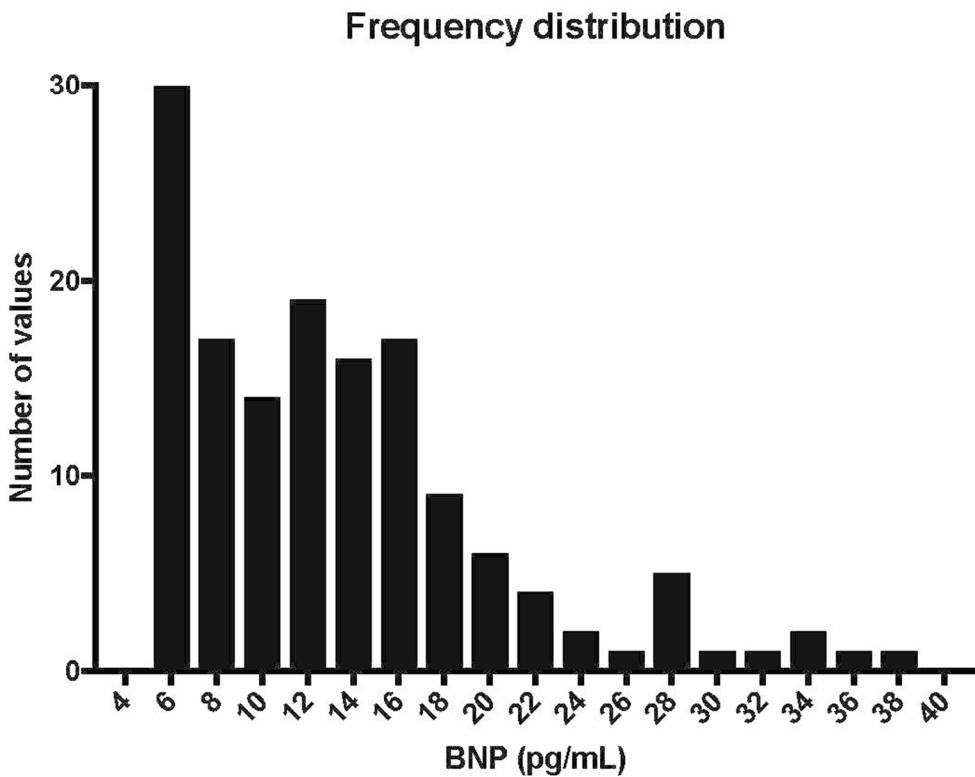


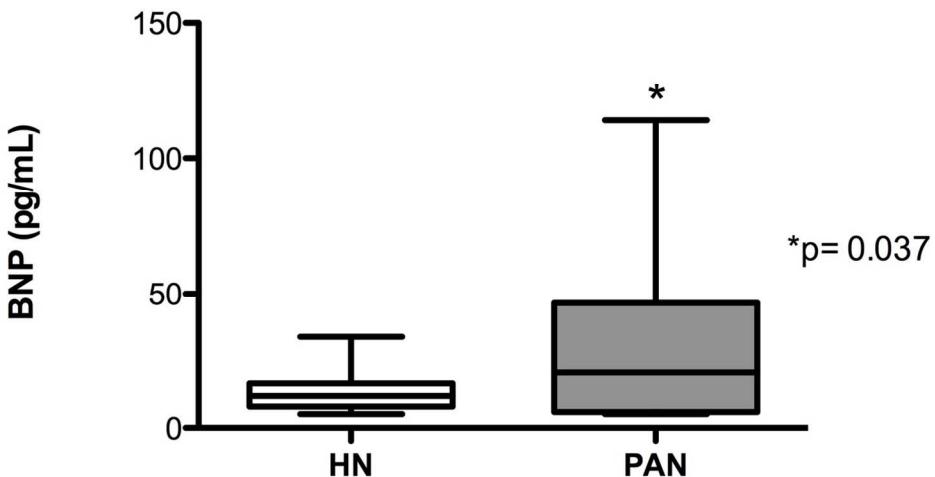
Figure 1. Flow diagram of study and BNP values

279x215mm (300 x 300 DPI)



- Figure 2. Shows the distribution of the BNP values in HN group. The right-skewed distribution was related to the limit of quantification of the equipment (5 pg/mL). Thus, a logarithmic transformation was performed. However, the distribution remains right-side skewed. Consequently, the reference interval was estimated using the rank-based method for non-parametric distribution.

91x72mm (300 x 300 DPI)



• Figure 3. Box plot of reference interval of BNP values in HN and PAN group (whiskers represent 2.5th and 97.5th percentiles).

125x66mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4 **STROBE 2007 (v4) Statement—Checklist of items that should be included in reports of cohort studies**

Section/Topic	Item #	Recommendation	Reported on page #
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	2
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	2
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	4
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	4
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	4-5
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	4-5
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants. Describe methods of follow-up	5
		(b) For matched studies, give matching criteria and number of exposed and unexposed	NA
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	5-6
Data sources/measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	5-6
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	4-5
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	6
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	6
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	6
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	6
		(c) Explain how missing data were addressed	7
		(d) If applicable, explain how loss to follow-up was addressed	NA
		(e) Describe any sensitivity analyses	NA
Results			7

Participants	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram	7 5
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest (c) Summarise follow-up time (eg, average and total amount)	7 NA
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures over time	5
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	7 7
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	8
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	9
Limitations			
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	12-13
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	13
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	3

*Give information separately for cases and controls in case-control studies and, if applicable, for exposed and unexposed groups in cohort and cross-sectional studies.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting. The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.