



UMELISA EGF®: un medio para la investigación y el diagnóstico acompañante de terapia personalizada

Idania González Pérez^{1,2,3*} <https://orcid.org/0000-0001-6448-7338>
Elisa María Castells Martínez⁴ <https://orcid.org/0000-0002-1841-2690>
Rubén del Valle García⁴ <https://orcid.org/0000-0001-5169-1196>
Kalet León Monzón^{1,5} <https://orcid.org/0000-0002-3709-7091>
Haslen Hassiul Cáceres Lavernia⁶ <https://orcid.org/0000-0002-5165-4472>
Antonio Melchor Rodríguez⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1106-6593>
Elizabeth Cuétara Lugo² <https://orcid.org/0000-0001-6634-4576>
Adriana Carr Pérez¹ <https://orcid.org/0000-0003-3278-2732>
Ernesto Carlos González Reyes⁴ <https://orcid.org/0000-0002-2131-1073>
Pedro Lucio Pérez Morás⁴ <https://orcid.org/0000-0003-1794-4983>
Pedro Camilo Rodríguez¹ <https://orcid.org/0000-0002-6546-6421>

¹ Centro de Inmunología Molecular. La Habana, Cuba

² Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. La Habana, Cuba

³ Universidad de Ciencias Médicas Victoria de Girón. La Habana, Cuba

⁴ Centro de Inmunoensayo. La Habana, Cuba

⁵ Titular de la Academia de Ciencias de Cuba. La Habana, Cuba

⁶ Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras. La Habana, Cuba

*Autor para la correspondencia: idania.gp@gmail.com; idanigop@infomed.sld.cu

Revisores

Gerardo Enrique Guillén Nieto Gerardo
Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba

Enrique Rogelio Arús Soler
Instituto Nacional de Gastroenterología.
La Habana, Cuba

Editor

Lisset González Navarro
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

RESUMEN

Introducción: La vacuna cubana CIMAvax-EGF®, es útil en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas con altas concentraciones séricas de factor de crecimiento epidérmico, su actual predictor de respuesta. Sin embargo, la discriminación por factor de crecimiento epidérmico entre individuos sanos y pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, que determina la exactitud diagnóstica y eficacia del biomarcador, es cuestionable debido principalmente a deficiencias metodológicas en su medición. **Métodos:** En este trabajo se desarrolló una metodología para la cuantificación de factor de crecimiento epidérmico sérico humano, dirigida a controlar los factores causa de sesgo y variabilidad en las estimaciones. La misma incluyó el desarrollo del estuche de cuantificación UMELISA EGF®, la estandarización de la separación de los sueros y la normalización de las concentraciones con referencia al conteo plaquetario, así como su interpretación. **Resultados:** El estudio evidenció que pacientes y controles sanos se diferencian por el factor de crecimiento epidérmico en circulación, medido en sueros separados 1 h después de la flebotomía ([EGF]_{1h}), y no por su provi-

Traductor

Yoañ Karell Acosta González
Academia de Ciencias de Cuba.
La Habana, Cuba

sión total en plaquetas, estimada en sueros colectados 4 h después de la extracción de la sangre ($[EGF]_{4h}$). Varias variables relacionadas con el factor de crecimiento epidérmico, con poder discriminatorio (valor diagnóstico) y potencialidad como biomarcador en cáncer de pulmón de células no pequeñas, fueron identificadas. En particular el factor de crecimiento epidérmico circulante ($[EGF]_{1h}$) y el retenido en las plaquetas ($[EGF]_{4h}-[EGF]_{1h}$), ambos normalizados por conteo plaquetario, discriminan mejor los pacientes que el EGF circulante o total. Conclusiones, la mayor capacidad discriminatoria de las variables normalizadas indica su relación más directa con la biología del tumor, comparadas con el biomarcador de eficacia actual; así como su mejor desempeño en la predicción de respuesta a terapias anti EGF/EGFR y a la vacuna CIMAvax-EGF® en particular; lo que unido a la inocuidad y el bajo costo de la prueba UMELISA EGF®, sugiere su posible empleo en la pesquisa y el diagnóstico temprano de la enfermedad en poblaciones de riesgo.

Palabras clave: UMELISA EGF®; CIMAvax-EGF®; cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPC-NP); factor de crecimiento epidérmico; biomarcador de eficacia

UMELISA EGF®: a useful tool for research and diagnosis

ABSTRACT

Introduction: The Cuban vaccine CIMAvax-EGF® is useful in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients with high serum concentrations of epidermal growth factor ([EGF]), the current predictor of response. However, the discrimination between healthy individuals and NSCLC patients by [EGF], which determines the diagnostic accuracy and efficacy of the biomarker, is questionable. The controversy occurs mainly due to methodological deficiencies in its estimation. **Methods:** This work presents a new methodology for the quantification of human serum EGF, aimed at controlling the factors causing bias and variability in the estimates. The approach includes the development of the quantification kit UMELISA EGF®, the standardization of sera separation, and the normalization of [sEGF] regarding platelets count, as well as its interpretation. **Results:** The study revealed that patients and controls differ only by circulating EGF, measured in sera separated 1h after phlebotomy ($[EGF]_{1h}$) and not by the total EGF in platelets, estimated in sera collected 4h after blood draw ($[EGF]_{4h}$). Several variables related to EGF, with discriminatory power (diagnostic value) and potentiality as a biomarker, were identified. Specially circulating ($[EGF]_{1h}$) and platelet-retained EGF ($[EGF]_{4h}-[EGF]_{1h}$), both normalized by platelets count, discriminate better patients from healthy controls than circulating or total EGF. Conclusions, the greater discriminatory capacity of the normalized variables indicates their more direct relationship with the biology of the tumor, compared to the current efficacy biomarker; as well as its better performance in predicting the response to anti-EGF/EGFR therapies and to the CIMAvax-EGF® in particular; which, together with the safety and low cost of the UMELISA EGF® test, suggests its possible use in the screening and early diagnosis of the disease in populations at risk.

Keywords: UMELISA EGF®; CIMAvax-EGF®; non-small cell lung cancer (NSCLC); epidermal growth factor (EGF); efficacy biomarker

INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye un problema de salud en la actualidad. Según la plataforma para estadísticas mundiales sobre cáncer Global Cancer Observatory, ⁽¹⁾ en el año 2020 el cáncer de pulmón (CP) fue la primera causa de muerte por tumores malignos a nivel global (18 %) y la segunda en incidencia (11,4 %), solo superada por el de mama. En Cuba los

carcinomas de tráquea, bronquios y pulmón están dentro de los tumores malignos más frecuentes, presentando la mayor tasa de mortalidad en ambos sexos al cierre del año 2019. ⁽²⁾ El diagnóstico temprano del CP, crítico en su manejo, es uno de los aspectos más importantes no resueltos, ⁽³⁾ que junto a la personalización de las terapias determina una mejor respuesta y supervivencia. Los biomarcadores aprobados

actualmente carecen de la sensibilidad, especificidad y reproducibilidad requeridas para el diagnóstico, incluso en estadios avanzados. ⁽⁴⁾ Consecuentemente, y debido a la ausencia de síntomas obvios, la mayoría de los pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP), subtipo histológico mayoritario, ⁽⁵⁾ se presentan en estadio localmente avanzado o metastásico. Este diagnóstico tardío hace inviable la cirugía estrechamente ligada al concepto de cura ⁽⁶⁾ y determina una tasa de supervivencia global (SG) a los 5 años de 4 % a 12 %, que podría elevarse a 50 % hasta 80 % si el diagnóstico ocurriera en estadio I. ^(4,7) En los últimos años la realización de tomografía computarizada de bajas dosis (TCBD), en poblaciones de alto riesgo, ha reducido sustancialmente la probabilidad de morir por CP y constituye el estándar actual para la pesquisa de la enfermedad; ^(4,6,8,9) aunque la prueba es costosa, los casos falsos positivos deben confirmarse por exámenes ocasionalmente más invasivos y la exposición repetida a radiaciones ionizantes puede causar cáncer en los sujetos pesquisados. ⁽¹⁰⁾

Las terapias dirigidas e inmunoterapias, cuya eficacia depende de la aplicación de biomarcadores predictores, también han incrementado la SG en pacientes con CPCNP. La vacuna cubana CIMAvax-EGF®, dirigida al factor de crecimiento epidérmico (EGF), se indica de manera personalizada desde el año 2018, ⁽⁶⁾ teniendo en cuenta la concentración de EGF sérico pretratamiento. ^(11,12) Sin embargo, el biomarcador presenta algunas limitaciones para predecir o explicar la respuesta en los pacientes. ^(11,13) Es conocido que la capacidad de un biomarcador para discriminar pacientes de controles sanos (valor diagnóstico) incide directamente en su desempeño. ⁽¹⁴⁾ En CPCNP, en particular, la capacidad discriminadora del EGF sérico, que sustentaría su eficacia en el pronóstico, la predicción o evaluación de respuesta a la vacuna, o el diagnóstico en sí mismo, se ha estudiado escasamente y los resultados no son concluyentes. ^(15,16) Igualmente existen informes contradictorios en otros tipos de cáncer, ⁽¹⁷⁻²⁰⁾ y patologías que presuntamente involucran al EGF. ⁽²¹⁻²⁴⁾ Estas incongruencias se deben principalmente a la variabilidad en las estimaciones del biomarcador, producto de la liberación de EGF por las plaquetas durante la separación de los sueros; y a la falta de armonización e incluso estandarización del procedimiento. En ese sentido, es relevante que las plaquetas constituyen el reservorio y fuente principal de EGF sérico. ⁽²⁵⁾ Consecuentemente, existe una correlación entre los niveles de EGF sérico y el conteo plaquetario, ^(26,27) que es dependiente del tiempo de colección del suero, ^(25,28) y de otros parámetros como el tipo de tubo para la colección de la sangre y la temperatura de incubación, ⁽²⁹⁾ los cuales tienen influencia directa en su coagulación y por tanto en la cinética de liberación del

EGF por las plaquetas. Adicionalmente, el polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, del inglés single nucleotide polymorphism) + 61 G > A, ⁽³⁰⁾ constituye otra fuente de variabilidad natural entre sujetos, ⁽³¹⁾ que socava la clasificación de los niveles de EGF sérico individuales en "bajos o altos". ⁽²⁷⁾ Este polimorfismo se ha asociado con el riesgo de cáncer, ^(30,32) su gravedad, ⁽³³⁾ pronóstico ⁽³⁴⁾ y respuesta al tratamiento. ⁽³⁵⁾ Sin embargo, hasta donde conocemos, no existen estudios de su impacto en la capacidad diagnóstica del EGF sérico en CPCNP. Por otra parte, las limitaciones del actual biomarcador de CIMAvax-EGF® podrían estar asociadas al establecimiento retrospectivo de su valor de corte, ^(11,12) en muestras de suero cuya obtención no fue estandarizada y validada como óptima; ⁽¹³⁾ aspecto crítico en la medicina de precisión. ⁽³⁶⁾ Asimismo, se ha reconocido que la selección del biomarcador mediante análisis de supervivencia post-hoc y dicotomización, adiciona un sesgo en su evaluación ⁽³⁷⁾ con impacto en la eficacia. ⁽³⁸⁾

Considerando los antecedentes presentados, la certera valoración del valor diagnóstico del EGF sérico depende del control de los factores que provocan variabilidad y sesgo en su estimación. Esto solo es posible en el contexto de una cuantificación estandarizada. Con ese objetivo se realizó la investigación que se presenta, como resultado de la cual se desarrolló una metodología de cuantificación de EGF sérico humano. Considerando el alto precio de los estuches comerciales, la misma concibió el desarrollo, validación y registro del ensayo UMELISA EGF®. ⁽³⁹⁾ La propuesta incluyó además la estandarización del proceso de separación de los sueros y la normalización e interpretación de las concentraciones de EGF con referencia al conteo plaquetario. Su aplicación permitió identificar varias variables relacionadas con el EGF con valor diagnóstico y potencialidad como biomarcador en CPCNP. ^(27,40)

MÉTODOS

La figura 1 resume el diseño y metodología de la investigación, que fue realizada en 3 etapas: desarrollo y validación del estuche UMELISA EGF®, estudio de los niveles de EGF en sueros de individuos sanos y evaluación del EGF sérico en pacientes con CPCNP. ^(39,27,40)

Muestra. Aspectos éticos

Entre octubre de 2014 y mayo de 2016, 25 pacientes con CPCNP, confirmados por técnicas cito-histológicas, fueron incluidos prospectivamente en el estudio. El rango de edad comprendido fue de 52 años a 76 años, con una mediana de 62,5 años y prevalencia del sexo masculino con relación 5 a 1 respecto a las mujeres. Se estudiaron además 105 individuos sanos cubanos, de 18 años a 78 años, con balance por sexo

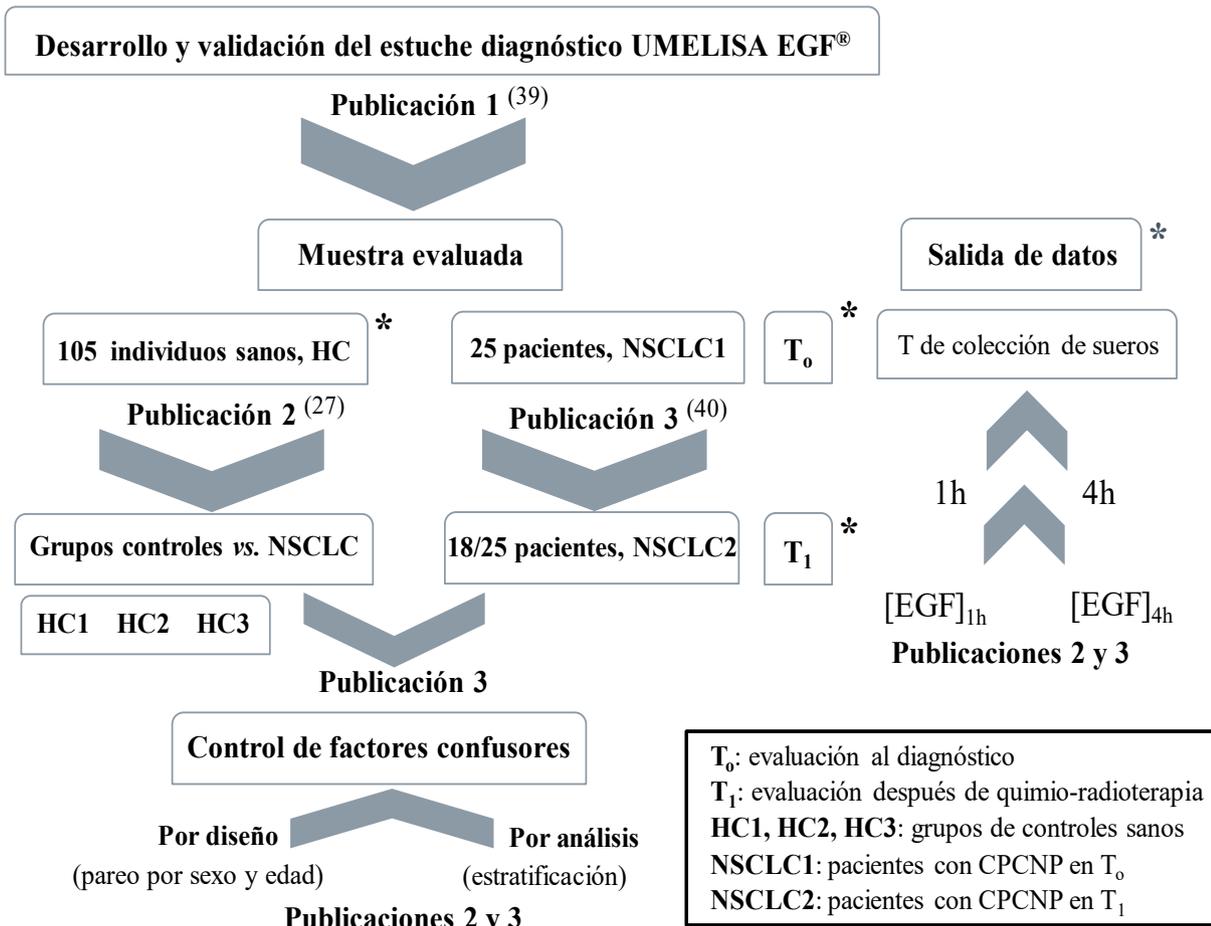


Fig. 1. Diseño de la investigación. Fuente: Elaboración propia

(52 mujeres y 53 hombres) y edad (mediana de 51 años para ambos sexos). Los grupos control para las comparaciones con los pacientes se conformaron a partir de la población sana estudiada. Los reclutamientos se realizaron según criterios definidos en el protocolo clínico y aprobados por los comités de ética de los centros involucrados. La voluntariedad de participación fue expresada por los sujetos mediante la firma del acta de consentimiento informado.

Flebotomía

En los sujetos sanos se realizó una única extracción de sangre tras la inclusión. En los pacientes se realizaron 2: en el momento del diagnóstico (tiempo cero-T₀) a los 25 pacientes incluidos en el estudio (NSCLC1), y de 4 semanas a 6 semanas después de haber concluido la quimio-radioterapia en primera línea (tiempo 1- T₁) a 18 de éstos que manifestaron su conformidad (NSCLC2).

Colecta de los sueros, cuantificación y variables de estudio

La estandarización de los procedimientos para la obtención de las muestras y su cuantificación, identificó 1 h

y 4 h como tiempos relevantes para la colección de los sueros. En todos los individuos estudiados cada extracción generó 2 concentraciones ([EGF]_{1h} y [EGF]_{4h}), cuantificadas con el estuche UMELISA EGF® desarrollado. Las muestras constituyen buenos estimadores del EGF circulante y de su provisión total en las plaquetas, respectivamente; y junto a los conteos plaquetarios se consideraron variables primarias, cuya combinación generó otras variables de estudio ([EGF]_{1h}/[EGF]_{4h}, d = [EGF]_{4h}-[EGF]_{1h}, [EGF]_{1h}/plaquetas/L, [EGF]_{1h}/plaquetas/L, d/plaquetas/L).

Control de factores de confusión

Los factores posible causa de sesgo en las comparaciones de EGF sérico se controlaron por diseño (pareo por sexo y edad de los grupos a comparar) y por análisis (estratificación por parámetros a comparar dentro/entre grupos).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estuche UMELISA EGF®

La figura 2 muestra en síntesis el estuche de cuantificación UMELISA EGF® desarrollado, (39) basado en un ELISA tipo



Fig. 2. Estuche UMELISA EGF®. Fuente: Elaboración propia

sándwich que emplea anticuerpos monoclonales en la fase sólida y en la detección (de captura y reportero biotinilado, respectivamente). El revelado ocurre por transformación del sustrato 4-metilumbeliferil fosfato en el producto fluorescente 4-metilumbeliferona, bajo la acción del conjugado estreptavidina-fosfatasa alcalina. La 4-metilumbeliferona tiene un máximo de excitación a una longitud de onda (λ) de 365 nm. La señal fluorescente emitida se lee a una λ en el rango de 420 nm -500 nm, con un máximo a 450 nm.

Este juego de reactivos está soportado sobre la plataforma cubana Sistema ultra micro analítico (SUMA) que incluye un lavador de placas MW-2001 y el fotómetro-fluorímetro PR-621 para la lectura de las placas o tiras de reacción. El lector se acopla a un ordenador dotado del paquete *strips reader software* (SRS), que realiza la cuantificación, validación de la prueba UMELISA e interpretación de sus resultados.

El estuche se validó por el productor Centro de Inmunoensayo, (CIE). La evaluación externa del desempeño para el registro en la agencia reguladora cubana, Centro para el Control Estatal de Medicamentos, Equipos y Dispositivos Médicos (CECMED), la realizó el Centro de Inmunología Molecular (CIM).

En ambos casos se verificó la concordancia de las cuantificaciones UMELISA con las del estuche comercial Quantikine® Human EGF Immunoassay kit (R&D, EE.UU.), que acompañó todo el proceso de desarrollo de la vacuna CIMAvax-EGF® y su inserción en la práctica clínica. Aunque no fue objetivo emular el *kit* comercial, la tabla 1 muestra un resumen de las características de ambos ensayos, que resalta en negritas las fortalezas respectivas.

Propuesta de nuevos biomarcadores

El mejor manejo y tratamiento de los pacientes con CPCNP depende de la evaluación de biomarcadores, cuya identificación exitosa no requiere de tamaños de muestra excesivos. ⁽⁴¹⁾ Este estudio clasifica como exploratorio, ^(14,42) en los cuales

el tamaño de la muestra oscila entre 25 y 200 ^(41,43) y con poca frecuencia alrededor de 25. ⁽⁴⁴⁻⁴⁹⁾ En la investigación que se presenta, la pequeña talla de la muestra no comprometió su representatividad en cuanto a variabilidad biológica. ⁽⁵⁰⁾ La misma reproduce, en sus aspectos demográficos y clínico-patológicos más importantes, la evaluada previamente por Rodríguez y colaboradores, ⁽¹¹⁾ con alrededor de 400 pacientes provenientes de 19 sitios clínicos y diferentes provincias del país.

El análisis de la capacidad discriminadora de las variables de estudio reveló que controles y pacientes no tratados (T_0) tienen como promedio igual reserva total de EGF, medido en muestras colectadas a las 4 h ($[EGF]_{4h}$). Esto lo que sugiere la irrelevancia de la variable en la fisiopatología tumoral. Asimismo, evidenció una mayor accesibilidad del EGF a la circulación en los pacientes como promedio, quienes muestran una media superior de EGF circulante ($[EGF]_{1h}$), una mayor fracción de EGF en circulación con respecto al total ($r = [EGF]_{1h}/[EGF]_{4h}$) y menos EGF retenido en las plaquetas ($d = [EGF]_{4h} - [EGF]_{1h}$). Este incremento del EGF libre en el torrente sanguíneo implica una mayor accesibilidad a este factor de crecimiento por parte del tumor, que podría ser relevante para la biología del CPCNP. En correspondencia, la normalización por conteo plaquetario evidenció más EGF contribuido a la circulación como promedio por plaqueta ($[EGF]_{1h}/\text{plaquetas/L}$) y consecuentemente menos EGF retenido como promedio también por plaqueta ($d/\text{plaquetas/L}$). Estos valores normalizados discriminan los pacientes incluso después de quimio-radioterapia, aunque ésta provoca una disminución en los niveles de EGF. Esto indica el mayor vínculo de las variables normalizadas con la biología del tumor, en comparación con el EGF circulante ($[EGF]_{1h}$) o su *stock* total ($[EGF]_{4h}$), y sugiere su mayor eficacia en la estratificación de los pacientes para la predicción de respuesta a terapias anti EGF/EGFR, así como su empleo potencial en la pesquisa de la enfermedad. En contraste, la reserva total promedio de EGF (figura 3A), aún normalizada

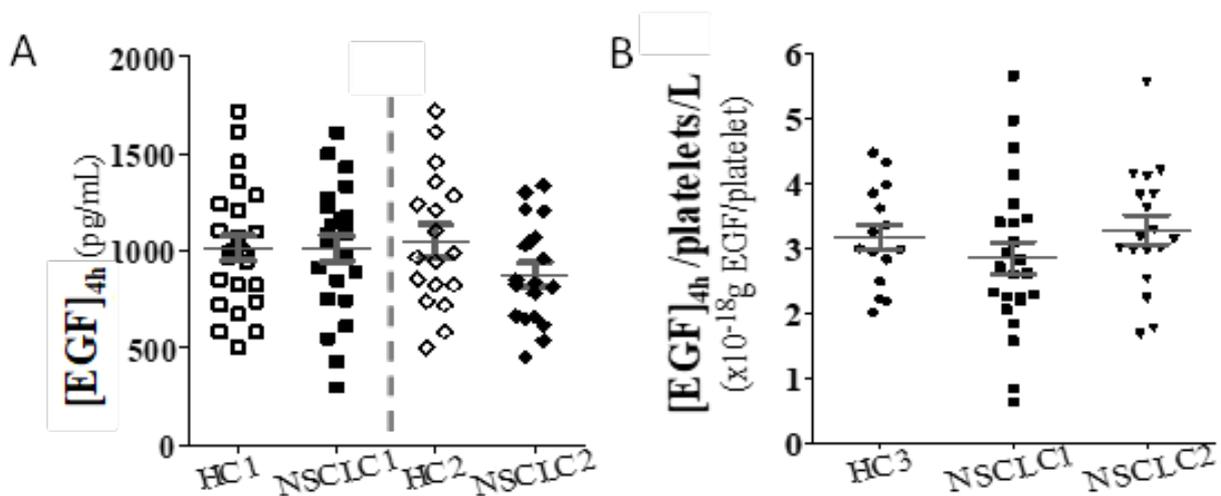


Fig. 3. Concentraciones séricas de EGF medidas a las 4 h: pacientes vs. controles sanos. A) Valores absolutos en pacientes al diagnóstico (NSCLC1) y después de quimio-radioterapia (NSCLC2), comparados con controles sanos emparejados por sexo y edad (HC1 y HC2, respectivamente). B) Análisis similar, basado en iguales concentraciones normalizadas por recuento de plaquetas en los pacientes (NSCLC1 y NSCLC2), en comparación con controles sanos (HC3). Fuente: Elaboración propia

por conteo plaquetario (figura 3B), no discrimina entre pacientes y controles, lo que indica nuevamente su irrelevancia en la fisiología tumoral.

El mejor desempeño de las variables normalizadas en la discriminación, está muy probablemente relacionado con el control que logran sobre las diferencias naturales interindividuales de los niveles de EGF sérico.^(30,31) La normalización del EGF circulante considera la variabilidad debida a variaciones en el recuento plaquetario, mientras que la normalización del EGF retenido en plaquetas considera también las diferencias de expresión de EGF causadas por el SNP + 61G > A.

Impacto científico

El desarrollo del estuche UMELISA EGF® permitió generar nuevo conocimiento científico. El estudio de los niveles de EGF desde una perspectiva integral, que considera la contribución de la variabilidad interindividual por niveles de expresión de EGF y conteos plaquetarios, es novedoso. La aplicación de la metodología estandarizada en el estudio de pacientes con CPCNP e individuos sanos, permitió esclarecer el valor diagnóstico del EGF, controversial hasta ese momento y explicar algunas limitaciones del biomarcador actual de eficacia de CIMAvax-EGF®. Adicionalmente, el estudio reveló que las variables normalizadas por conteo plaquetario constituyen potenciales biomarcadores para la estratificación de los pacientes y la predicción de su respuesta a la vacuna CIMAvax-EGF® u otras terapias anti-EGF/EGFR.

El alcance del resultado podría extenderse a otras patologías en las cuales el protagonismo del EGF ha sido reportado (aterosclerosis, diabetes mellitus, Alzheimer, depresión, autismo, esquizofrenia, entre otros),⁽⁵¹⁻⁵⁹⁾ contribuyendo a una

mejor lectura de sus niveles en suero y al aclaramiento de la relación de la molécula con la enfermedad. Adicionalmente, podría ser útil en el estudio de otras citosinas y factores de crecimiento también almacenados en las plaquetas: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante- β (TGF β) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), por citar algunos ejemplos; para los cuales la cinética de liberación podría ser muy similar a la descrita para el EGF, con un impacto análogo en las mediciones y la clínica.

Impacto social

El acompañamiento de CIMAvax-EGF® con el estuche UMELISA EGF® posibilita un manejo de precisión del paciente y el uso racional de la vacuna, facilitando su aplicación masiva en el país, con el impacto correspondiente en la clínica y evolución de los pacientes.

El empleo de la metodología desarrollada en el estudio de otros tumores epiteliales malignos, y en particular la interpretación de sus perfiles de EGF sérico a partir de las variables alternativas propuestas, permitirá la determinación de dependencia del EGF en los mismos para la proliferación y la inferencia de un supuesto beneficio de la utilización de la vacuna CIMAvax-EGF® u otras terapias dirigidas al sistema EGF/EGFR. Esto propiciará la ejecución de ensayos clínicos controlados con estas terapias y la extensión de su aplicación en las nuevas localizaciones seleccionadas, así como la disponibilidad de nuevas alternativas de tratamiento para los pacientes no respondedores a terapias previas.

Adicionalmente, los nuevos biomarcadores podrían complementar el conocimiento de la patofisiología de otras en-

Tabla 1. Comparación entre los estuches UMELISA EGF® y Quantikine® Human EGF

Aspecto	UMELISA EGF® (TecnoSUMA, Cuba)	Quantikine (R&D, EE. UU.)
Indicación	IVD	FRUO. No para diagnóstico
Soberanía Tecnológica	Sí	No
Estabilidad del kit	2 meses, 2°C-8 °C	1 mes, 2 °C -8 °C
Costo determinación	~ 15 CUP	~ 750 CUP
Tipo de muestra	Suero	Suero/Plasma/Orina
Automatización	Semiautomático	Semiautomático
Devuelve/Cálculo	[EGF] en pg/mL/Software con control de calidad	Señales de absorbancia/Manual
Duración del ensayo	17 h-19 h Incubaciones (16 h-18h muestras, 30 min conjugado, 30 min sustrato)	5 h Incubaciones (2h muestras, 2 h conjugado, 20 min sustrato)
Control de placa	Sí	No
Señal/ λ lectura	Fluorescencia/450 nm	Densidad óptica/450 nm, con corrección a 540 nm /570 nm
Curva efectiva/calibradores	12,5 pg/mL-250 pg/mL/movibles EI EGF (NIBSC)	3,9 pg/mL-250 pg/mL/ fijos EGF humano recombinante calibrado vs. EI EGF (NIBSC)
Sándwich en el Elisa	Ac de captura monoclonal/ Ac reportero monoclonal-biotinilado	Ac captura monoclonal/ Ac reportero policlonal POX
Montaje fraccionado	Sí	Sí
Lectura cinética	Sí	No
Montaje	Cómodo	Trabajoso
LD (pg/mL)	10	1
LQ (pg/mL)	39	3,9
Exactitud (%)	80-120	80-120
CV (%)	< 10	< 10

IVD: del inglés *in vitro diagnostic*; FRUO, del inglés *for research use only*; NIBSC, del inglés *National Institute for Biological Standards and Control*; EI: estándar internacional; EGF, del inglés *Epidermal Growth Factor*; Ac, anticuerpo. Fuente: Elaboración propia

fermedades que involucran al EGF (aterosclerosis, diabetes, Alzheimer, autismo, entre otras), con beneficio en el manejo de los pacientes.

Impacto económico

El estuche UMELISA EGF®, basado en la tecnología SUMA de bajo costo y amplia cobertura, permite el ahorro de divisas por concepto de importaciones y garantiza soberanía tecnológica. El empleado anteriormente, de procedencia norteamericana, tiene un elevado precio en el mercado, con un costo por determinación 50 veces superior (15 USD). Según cifras del registro de medicamentos de alto costo del INOR, considerando el número de pacientes tratados con CIMAvax-EGF® en el año 2019, el empleo del UMELISA EGF® solo en la determinación inicial para la indicación del tratamiento prevé un

ahorro anual de 2148 USD. Llevado a nivel de país la cifra se aproximaría al medio millón de dólares anuales.

Por otra parte, la aplicación racional de la vacuna en los pacientes cubanos significa un importante ahorro económico para el país, e incluso podría representar ingresos adicionales a partir de la exportación de dosis excedentes de vacuna. El estuche posibilita además la salida al mercado de CIMAvax-EGF® con su diagnosticador acompañante, como paquete y producto más completo y competitivo, con la consecuente repercusión en las exportaciones e ingresos. Adicionalmente, podría representar un importante renglón exportable a países como Colombia, donde se comercializa la tecnología SUMA y está siendo utilizado para la estratificación de los pacientes con cáncer de pulmón.

Conclusiones

La novedad científica del trabajo radica en la demostración de que las plaquetas liberan el EGF más rápidamente en los pacientes con CPCNP que en los individuos sanos. Tanto pacientes como controles sanos tienen en promedio el mismo stock total de EGF en plaquetas, pero los pacientes tienen más EGF en circulación como promedio. Además, mientras que la literatura suele reportar concentraciones absolutas de EGF sérico, el estudio propone su corrección por el EGF total expresado y por el recuento de plaquetas. El ajuste se logra mediante variables como r ($[EGF]_{1h}/[EGF]_{4h}$, la fracción que representa el EGF circulante de su stock total) y d ($[EGF]_{4h}-[EGF]_{1h}$, la cantidad estimada de EGF retenido en las plaquetas), así como a a través del EGF circulante y el retenido en plaquetas, normalizados ambos por conteo plaquetario ($[EGF]_{1h}/\text{plaquetas/L}$ y $([EGF]_{4h}-[EGF]_{1h})/\text{plaquetas/L}$, respectivamente).

La mayor capacidad discriminadora de las nuevas medidas sugiere que son variables más relacionadas con la biología tumoral y, por tanto, podrían ser más útiles como biomarcadores. La identificación de posibles predictores séricos de respuesta a CIMAvax-EGF® es clínicamente relevante. La mayoría de los biomarcadores de eficacia introducidos en la práctica clínica constituyen alteraciones genéticas que requieren material de biopsia y técnicas costosas para su evaluación. La prueba de biomarcadores UMELISA EGF®, en cambio, es simple, mínimamente invasiva y económica. Estos biomarcadores alternativos podrían ayudar a identificar otros tumores dependientes de EGF, en los que las terapias dirigidas a EGF/EGFR podrían ser apropiadas.

En nuestra opinión, los biomarcadores propuestos, validados clínicamente, podrían apoyar la indicación personalizada de CIMAvax-EGF® en primera línea de tratamiento, en función de su positividad como ocurre con otras terapias dirigidas. La inmunización con esta inmunoterapia contrasta con la quimioterapia y radioterapia, que son inespecíficas y agresivas y pueden comprometer el estado inmunológico de los pacientes. Este escenario de aplicación de CIMAvax-EGF® podría potenciar su efecto, que depende de una respuesta inmunitaria anti-EGF eficaz.

No obstante, el mayor impacto de los nuevos biomarcadores y de la prueba UMELISA EGF® podría estar asociado a una detección más temprana del proceso maligno, mediante el cribado a gran escala en poblaciones de riesgo; como complemento a la TCBD, la radiología tradicional y otros métodos en uso para el diagnóstico de la enfermedad y de su progresión.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer. [internet] 2022 [consultado 29 abr]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/>

- Dirección de Registros Médicos, Ministerio de Salud Pública de Cuba, La Habana. Anuario Estadístico de Salud 2019-2020.
- Latini G, De Felice C, Barducci A, Dipaola L, Gentile M, Andreassi MG, et al. Clinical biomarkers for cancer recognition and prevention: A novel approach with optical measurements. *Cancer Biomark* 2018;22(2):179-98.
- Calabrese F, Lunardi F, Pezzuto F, Fortarezza F, Vuljan SE, Marquette C, et al. Are There New Biomarkers in Tissue and Liquid Biopsies for the Early Detection of Non-Small Cell Lung Cancer? *J Clin Med*. 2019;8(3):414.
- Rosell R, Karachaliou N. Large-scale screening for somatic mutations in lung cancer. *The Lancet*. 2016; 387(10026):1354-6.
- Romero, TA, Gisela, Bermejo, Walkiria, Monzón, Abel. Programa Integral para el control del cáncer en Cuba. Guía de cáncer de pulmón. Acciones para su control. MINSAP. 2016;1-143.
- Liang B, Shao Y, Long F, Jiang S-J. Predicting Diagnostic Gene Biomarkers for Non-Small-Cell Lung Cancer. *BioMed Res Int*. 2016; 2016:1-8.
- Lam S, Tammemagi M. Contemporary issues in the implementation of lung cancer screening. *Eur Respir Rev*. 2021;30(161).
- Seijo LM, Trujillo JC, Zulueta JJ. Cribado en cáncer de pulmón: últimas evidencias. *Arch. bronconeumol.*(Ed. impr.). 2020;7-8.
- Smith RA, Andrews KS, Brooks D, Fedewa SA, Manassaram-Baptiste D, Saslow D, et al. Cancer Screening in the United States, 2018: A Review of Current American Cancer Society Guidelines and Current Issues in Cancer Screening. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(4):297-316.
- Rodríguez PC, Popa X, Martínez O, Mendoza S, Santiesteban E, Crespo T, et al. A Phase III Clinical Trial of the Epidermal Growth Factor Vaccine CIMAvax-EGF as Switch Maintenance Therapy in Advanced Non-Small Cell Lung Cancer Patients. *Clin Cancer Res*. 2016;22(15):3782-90.
- Crombet Ramos T, Neningen E, Gonzalez J, Rodríguez PC, García B, Popa X, et al. EGF-based cancer vaccine: Optimizing predictive and surrogate biomarkers. *ASCO*; 2013.
- Crombet Ramos T, Rodríguez PC, Neningen Vinageras E, García Verdecia B, Lage Davila A. CIMAvax EGF (EGF-P64K) vaccine for the treatment of non-small-cell lung cancer. *Expert Rev Vaccines*. 2015;14(10):1303-11.
- Duffy MJ, Sturgeon CM, Sölétormos G, Barak V, Molina R, Hayes DF, et al. Validation of New Cancer Biomarkers: A Position Statement from the European Group on Tumor Markers. *Clin Chem*. 2015;61(6):809-20.
- Lemos Gonzalez Y, Rodríguez Berrocal F, Cordero O, Gomez C, de la Cadena MP. Alteration of the serum levels of the epidermal growth factor receptor and its ligands in patients with non-small cell lung cancer and head and neck carcinoma. *Br J Cancer*. 2007;96(10):1569-78.
- Blanco Prieto S, Vazquez Iglesias L, Rodríguez Gironde M, Barcia Castro L, Fernández-Villar A, Botana Rial MI, et al. Serum Calprotectin, CD26 and EGF to Establish a Panel for the Diagnosis of Lung Cancer. *PLoS One*. 2015;10(5):e0127318.
- Baron AT, Lafky JM, Boardman CH, Balasubramaniam S, Suman VJ, Podratz KC, et al. Serum sErbB1 and Epidermal Growth Factor Levels As Tumor Biomarkers in Women with Stage III or IV Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Epidem Biomark*. 1999;8(2):129-37.

18. Balcan E, Demirkiran F, Aydin Y, Sanioglu C, Bese T, Arvas M, *et al.* Serum Levels of Epidermal Growth Factor, Transforming Growth Factor, and c-erbB2 in Ovarian Cancer. *Int J Gynecol Cancer.* 2012;22(7): 1138-42.
19. Masiak W, Szponar A, Chodorowska G, Dąbrowski A, Pedowski T, Wallner G. Evaluation of endostatin and EGF serum levels in patients with gastric cancer. *Pol Przegl Chir.* 2011;83(1):42-7.
20. Hirotsawa T, Saito N, Kameoka S, Kobayashi M. Clinical Significance of Epidermal Growth Factor (EGF) Expression for Assessing the Spreading of Human Colon Cancer. *J Jpn Soc Coloproctol.* 2002;55(8):402-12.
21. Hochstrasser T, Ehrlich D, Marksteiner J, Sperner-Unterweger B, Humpel C. (2012) Matrix metalloproteinase-2 and epidermal growth factor are decreased in platelets of AD. *Curr Alzheimer Res.* 2012;9(8):982-9.
22. Humpel C, Hochstrasser T. Cerebrospinal fluid and blood biomarkers in AD. *World J Psychiatr.* 2011;1(1):8-18.
23. Lundstam U, Hägg U, Bergmann Sværiddottir Y, Svensson LE, Gan L-m. Epidermal growth factor levels are related to diastolic blood pressure and carotid artery stiffness. *Scand Cardiovasc J.* 2007;41(5):308-12.
24. Berrahmoune H, Lamont JV, Herbeth B, Lambert D, Masson C, McPhillips M, *et al.* Association between EGF and lipid concentrations: a benefit role in the atherosclerotic process? *Clin Chim Acta.* 2009;402(1-2):196-8.
25. Oka Y, Orth D. Human plasma epidermal growth factor/betaurogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest.* 1983;72(1):249-59.
26. Lev-Ran A, Hwang DL, Snyder DS. Human serum and plasma have different sources of epidermal growth factor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1990;259(3):R545-R8.
27. González Pérez I, Cáceres Lavernia HH, Car Pérez A, & León Monzón K. (2017). Measurement of Serum EGF Levels, a Methodological Approach: Learning What Means Low-/High-Concentration of EGF In Serum". Some Clinical Implications. *J Mol Biomark Diagn,* 8(335), 2.
28. Savage A, Chatterjee V, Gregory H, Bloom S. Epidermal growth factor in blood. *Regul Pept.* 1986; 16(3-4):199-206.
29. Yucel A, Karakus R, Aybay C. Effect of blood collection tube types on the measurement of human epidermal growth factor. *J Immunoassay Immunochem.* 2007;28(1):47-60.
30. Shahbazi M, Pravica V, Nasreen N, Fakhoury H, Fryer AA, Strange RC, *et al.* Association between functional polymorphism in EGF gene and malignant melanoma. *Lancet.* 2002;359(9304):397-401.
31. Pantsulaia I, Trofimov S, Kobylansky E, Livshits G. Heritability of circulating growth factors involved in the angiogenesis in healthy human population. *Cytokine.* 2004;27(6):152-8.
32. De Mello R. EGF+61 A>G Polymorphisms and Lung Cancer Risk: Future Directions. *J Pulmonar Respirat Med S.* 2012;5:2.
33. Kohla MAS, Al-Haddad OK, Nada A, Al-Warraky M, Obada M, Amer M, *et al.* Association of serum levels of epidermal growth factor with disease severity in patients with unresectable hepatocellular carcinoma. *Hepatoma Res.* 2016;2:18-25.
34. Yoshiya S, Fujimoto Y, Bekki Y, Konishi H, Yamashita Yi, Ikegami T, *et al.* Impact of epidermal growth factor single-nucleotide polymorphism on recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Cancer Sci.* 2014;105(6):646-50.
35. Hu-Lieskovan S, Vallbohmer D, Zhang W, Yang D, Pohl A, Labonte MJ, *et al.* EGF61 Polymorphism Predicts Complete Pathologic Response to Cetuximab-Based Chemoradiation Independent of KRAS Status in Locally Advanced Rectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2011;17(15):5161-9.
36. Seijo LM, Peled N, Ajona D, Boeri M, Field JK, Sozzi G, *et al.* Biomarkers in Lung Cancer Screening: Achievements, Promises, and Challenges. *J Thorac Oncol.* 2019;14(3):343-57.
37. Luaces P, Sánchez L, Saavedra D, Crombet T, Van der Elst W, Alonso A, *et al.* Identifying predictive biomarkers of CIMAvaxEGF success in advanced Lung Cancer Patients. *BMC Cancer.* 2020; 20:772-6.
38. Curran Everett D, Milgrom H. Post-hoc data analysis: benefits and limitations *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* 2013;13(3):223-4.
39. Castells EM, del Valle R, González EC, Melchor A, Pérez PL, González I, *et al.* An enzyme immunoassay for determining epidermal growth factor (EGF) in human serum samples using an ultramicroanalytical system. *J Immunoassay Immunochem.* 2017;38(2):190-201.
40. Idania G, Hassiul C, Camilo R, Adriana C, Kalet L. Normalized serum EGF levels as a potential biomarker in non-small cell lung cancer: the role of platelets. *J Mol Biomark Diagn.* 2018;9(402):2.
41. Pérez-Gracia J, Sanmamed M, Bosch A, *et al.* Strategies to design clinical studies to identify predictive biomarkers in cancer research. *Cancer Treat Rev.* 2017;53:79-97.
42. Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 2013;9(2):280-99.
43. Wallstrom G, Anderson K, LaBaer J. Biomarker Discovery for Heterogeneous Diseases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22:1-17.
44. Marčišauskasa S, Ulfenborg B, Kristjansdottir B, *et al.* Univariate and classification analysis reveals potential diagnostic biomarkers for early stage ovarian cancer Type 1 and Type 2. *J Proteomics.* 2019;196:57-68.
45. de Siqueira L, Wanderley M., da Silva R, *et al.* A Screening Study of Potential Carcinogen Biomarkers After Surgical Treatment of Obesity. *Obes Surg.* 2018;28:2487-93.
46. Thanarajasingam G, Maurer M, Habermann T, *et al.* Low Plasma Omega-3 Fatty Acid Levels May Predict Inferior Prognosis in Untreated Diffuse Large B-Cell Lymphoma: A New Modifiable Dietary Biomarker? *Nutr Cancer.* 2018;70:1088-90.
47. Dunphy M, Harding J, Venneti S, *et al.* In Vivo PET Assay of Tumor Glutamine Flux and Metabolism: In-Human Trial of 18F-(2S,4R)-4-Fluoroglutamine. *Radiology.* 2018;287:667-75.
48. Yilmaz E, Gul M, Melekoglu R, *et al.* Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 4-like: a new biomarker in the pathophysiology of endometrial cancer. *J Int Med Res.* 2018;46:3709-16.
49. McAnena P, Tanriverdi K, Curran C, *et al.* Circulating microRNAs miR-331 and miR-195 differentiate local luminal A from metastatic breast cancer. *BMC Cancer.* 2019;19:436-45.
50. Oberg A, Vitek O. Statistical design of quantitative mass spectrometry-based proteomic experiments. *J Proteome Res.* 2009;8:2144-56.

51. Lamb D, Modjtahedi H, Plant N, *et al.* EGF mediates monocyte chemotaxis and macrophage proliferation and EGF receptor is expressed in atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis*. 2004;176:21-6.
52. Oxford G, Tayaria L, Barfoot M, *et al.* Salivary EGF levels reduced in diabetic patients. *J Diabetes Its Complicat*. 2000;14:140-5.
53. Hochstrasser T, Ehrlich D, Marksteiner J, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 and epidermal growth factor are decreased in platelets of AD. *Curr Alzheimer Res*. 2012;9:982-9.
54. Ray S, Britschgi M, Herbert C, *et al.* Classification and prediction of clinical Alzheimer's diagnosis based on plasma signaling proteins. *Nat Med*. 2007;13:1359-62.
55. Marksteiner J, Kemmler G, Weiss E, *et al.* Five out of 16 plasma signaling proteins are enhanced in plasma of patients with mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011; 32: 539-40.
56. Plagg B, Marksteiner J. Platelet dysfunction in hypercholesterolemia mice, two Alzheimer's disease mouse models and in human patients with Alzheimer's disease. *Biogerontology*. 2015; 16: 543-558.
57. Tian W, Zhang J, Zhang K, *et al.* A study of the functional significance of epidermal growth factor in major depressive disorder. *PsychGenet*. 2012; 22: 161-7.
58. Suzuki K, Hashimoto K, Iwata Y, *et al.* Decreased serum levels of epidermal growth factor in adult subjects with high-functioning autism. *Biol Psychiatry*. 2007; 62: 267-9.
59. Futamura T, Kakita A, Tohmi M, *et al.* Neonatal perturbation of neurotrophic signaling results in abnormal sensorimotor gating and social interaction in adults: Implication for epidermal growth factor in cognitive development. *Mol Psychiatry*. 2003; 8: 19-29.

Recibido: 19/06/2022

Aprobado: 21/09/2022

Agradecimientos

Los autores agradecen, al grupo de compañeros de las instituciones participantes, por su valioso aporte y colaboración en el desarrollo del estudio UMELISA EGF® y en las investigaciones realizadas con el mismo, que permitieron la propuesta de nuevos biomarcadores de eficacia de la vacuna CIMAvax-EGF®.

Agradecimientos especiales a: Adriana González Quintero, Arien Sánchez González, Lourdes M. Alfonso García, Abelardo Quintero Zamora, Norberto Rivero Hernández, Yaimel Díaz Marín, Juliette Cazanave Mora, Marta E. Legrá Torres, Lisandra González Inguanzo, Liliana Hernández Pérez, Odelaysis Moré Soler; todos del CIE. Lisel Viña Rodríguez, Jenneby Filgueiras Lache; Beatriz García Verdecia, Xitllaly Popa, Bárbara Wilkinson Brito, Patricia Luaces, Amnelys González Morera, Zuyén González, Esperanza Echevarría, Zaima Mazorra, Danay Saavedra; Belkis Felicia Escobar y Milagros Carmona Forcade; de Control de la Calidad, Ensayos Clínicos y Consultorio Médico del CIM. Elia Neninger Vinagueras, Jorge Luis Soriano García; María Elena Suardiáz Espinosa, Ana María Arias Prieto, Regla Ramos Duarte, Tania Hidalgo Costa; del Servicio de Oncología, Laboratorio

Clínico y Comité de Ética del HHA. Midsay López Leyte, Elizabeth Reyes Reyes y Loida Oruña Sánchez, del Departamento de Estadística y Registro de Medicamentos y del Laboratorio de Farmacología del INOR.

Conflictos de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de interés en relación con la investigación presentada.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Idania González, Kalet León, Elisa Castells

Curación de datos: Idania González, Kalet León, Elisa Castells, Rubén del Valle

Análisis formal: Idania González, Kalet León, Elisa Castells

Adquisición de fondos: Kalet León, Antonio Melchor

Investigación: Idania González, Elisa Castells, Rubén del Valle

Metodología: Idania González, Kalet León, Elisa Castells, Rubén del Valle

Administración del proyecto: Idania González, Kalet León, Pedro Camilo, Elisa Castells

Recursos: Idania González, Elisa Castells, Haslen Hassiul Cáceres, Adriana Carr, Rubén del Valle, Ernesto Carlos González, Antonio Melchor, Pedro Lucio Pérez, Elizabeth Cuétara

Software: Idania González, Adriana Carr, Elisa Castells, Rubén del Valle

Supervisión: Kalet León, Adriana Carr, Elizabeth Cuétara

Validación: Idania González, Elisa Castells, Rubén del Valle, Adriana Carr

Visualización: Idania González, Elisa Castells

Redacción-borrador original: Idania González, Elisa Castells

Redacción-revisión y edición: Idania González, Elisa Castells, Rubén del Valle, Kalet León, Adriana Carr, Haslen Hassiul Cáceres, Ernesto Carlos González, Antonio Melchor, Pedro Lucio Pérez, Pedro Camilo, Elizabeth Cuétara

Financiamiento

Los autores de la investigación que se presenta no recibieron fondos u otros honorarios para su realización. Las determinaciones de EGF se realizaron con los estuches suministrados al Centro de Inmunología Molecular por el Centro de InmunoEnsayo.

Cómo citar este artículo

González Pérez I, Castells Martínez EM, del Valle García R, León Monzón K et al. UMELISA EGF: un medio para la investigación y el diagnóstico acompañante de terapia personalizada. *An Acad Cienc Cuba [internet]* 2022 [citado en día, mes y año];13(2):e1265. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1265>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.

