



Cuba Salud

IV Convención
Internacional de Salud
17-21 de octubre, 2022

EGF sérico normalizado por plaquetas: metodología para su estimación y evaluación como biomarcador en cáncer

Idania González Pérez¹
Elisa María Castells Martínez²
Haslen Hassiul Cáceres Lavernia³
Kalet León Monzón⁴

¹ Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología (INOR)/Sección de Farmacología, La Habana, Cuba, idania.gp@gmail.com

² Centro de Inmunoensayo (CIE)/Laboratorio de Pesquisa Neonatal, La Habana, Cuba, elisa.castells@cie.cu

³ Hospital Clínico Quirúrgico Hermanos Ameijeiras (HHA)/Servicio de Oncología, La Habana, Cuba, haslen.caceres@infomed.sld.cu

⁴ Centro de Inmunología Molecular (CIM)/Dirección de Investigaciones, La Habana, Cuba, kalet@cim.sld.cu

Resumen: *Introducción:* La vacuna cubana CIMAvax-EGF[®], es útil en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP) con altas concentraciones séricas de factor de crecimiento epidérmico ([EGF]). Sin embargo, la discriminación por [EGF] entre pacientes e individuos sanos, que determina la exactitud diagnóstica y eficacia del biomarcador, es cuestionable debido a deficiencias metodológicas en su medición. *Métodos:* En este trabajo se desarrolló una metodología para la cuantificación de EGF sérico humano, dirigida a controlar los factores causa de sesgo y variabilidad en las estimaciones, que incluyó el desarrollo del estuche de cuantificación *UMELISA EGF*[®], la estandarización de la separación de los sueros y la normalización de las concentraciones por conteo plaquetario. *Resultados:* El estudio evidenció la capacidad discriminatoria (valor diagnóstico) del EGF en circulación, medido en sueros separados 1h después de la flebotomía ([EGF]_{1h}); a diferencia de la provisión total en plaquetas, estimada en sueros colectados a las 4h ([EGF]_{4h}). Se identificaron varias variables relacionadas con el EGF, con potencialidad como biomarcador en CPCNP. En particular el EGF 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.

Palabras clave: *UMELISA EGF*[®]; CIMAvax-EGF[®]; cáncer de pulmón de células no pequeñas (CPCNP); factor de crecimiento epidérmico (EGF); biomarcador de eficacia

I. INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye un problema de salud. Según la plataforma “*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 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, se presentan en estadio localmente avanzado o metastásico. Este diagnóstico tardío hace inviable la cirugía, estrechamente ligada al concepto de cura y determina una tasa de supervivencia global (SG) a los cinco años de 4%-12%, que podría elevarse a 50%-80% si el diagnóstico ocurriera en estadio I.^(4,5) En los últimos años, la tomografía computarizada de bajas dosis (TCBD) ha reducido sustancialmente la probabilidad de morir por CP en poblaciones de alto riesgo, constituyendo el estándar actual para la pesquisa de la enfermedad.^(4,6,7) Sin embargo, 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.

Las terapias dirigidas e inmunoterapias, cuya eficacia depende de la aplicación de biomarcadores para su predicción, también han incrementado la SG en los pacientes. La vacuna cubana CIMAvax-EGF[®], dirigida al Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF), se indica de manera personalizada teniendo en cuenta la concentración de EGF sérico pre-tratamiento,^(8,9) aunque el biomarcador no permite predecir o explicar la respuesta en todos los pacientes.^(8,10) Es conocido que la capacidad discriminadora de un biomarcador (valor diagnóstico) incide directamente en su desempeño.⁽¹¹⁾ En diversos tipos de cáncer y patologías que presuntamente involucran al EGF, y en CPCNP en particular, la capacidad discriminadora del EGF sérico, que sustentaría su eficacia en el pronóstico, predicción, evaluación de respuesta a tratamientos, y el diagnóstico en sí mismo, se ha estudiado escasamente con resultados no concluyentes.^(12,13) Las incongruencias se deben principalmente a la variabilidad en la cuantificación del biomarcador, producto de carencias metodológicas. En ese sentido, es relevante que las plaquetas constituyen el reservorio y fuente principal de EGF sérico.⁽¹⁴⁾ Consecuentemente, existe una correlación entre sus niveles séricos y el conteo plaquetario,^(15,16) que es dependiente del tiempo de colección del suero,⁽¹⁴⁾ y de otros parámetros como el tipo de tubo para la colección de la sangre y la temperatura de incubación.⁽¹⁷⁾ Adicionalmente, el polimorfismo de un solo nucleótido SNP +61G>A⁽¹⁸⁾ constituye otra fuente de variabilidad entre sujetos,⁽¹⁹⁾ que socava la clasificación de los niveles de EGF sérico individuales en “bajos o altos” y cuyo impacto en la capacidad diagnóstica de la molécula en CPCNP no ha sido estudiado, hasta donde conocemos. Las limitaciones del biomarcador actual de CIMAvax-EGF[®], podrían también estar asociadas al establecimiento retrospectivo de su valor de corte,^(8,9) en muestras de suero cuya obtención no fue estandarizada y validada como óptima;⁽¹⁰⁾ aspecto crítico en la medicina de precisión. Asimismo, se ha reconocido que la selección del biomarcador mediante análisis de supervivencia *post-hoc* y dicotomización, adiciona un sesgo en su evaluación,⁽²⁰⁾ con impacto en la eficacia. Con estos antecedentes, se desarrolló una metodología para la cuantificación fiable y normalizada de EGF sérico humano; que concibió el desarrollo, validación y registro del ensayo *UMELISA EGF*[®].⁽²¹⁾

II. MÉTODO

A. Muestra. Aspectos éticos

De octubre de 2014 a mayo de 2016, 25 pacientes con CPCNP (52-76 años, mediana 62,5 años, relación hombre : mujer de 5:1), confirmados por técnicas cito-histológicas, fueron incluidos en el estudio. (22) Para la conformación de los grupos control se estudiaron 105 individuos sanos (18-78 años, mediana 51 años para ambos sexos, 52 mujeres y 53 hombres). (16) El protocolo clínico fue aprobado por los Comités de Ética respectivos y la voluntariedad de participación se expresó mediante la firma del documento de consentimiento informado.

B. Colecta de los sueros, cuantificación y variables de estudio

Los sujetos sanos se evaluaron tras la inclusión. Los pacientes en el momento del diagnóstico (tiempo T_0 , $n=25$, NSCLC1) y de cuatro a seis semanas después de la quimio-radioterapia en primera línea (tiempo T_1 , $n=18/25$, NSCLC2). Se identificaron como tiempos relevantes para la colección de los sueros 1h y 4h. Así cada extracción generó dos concentraciones ($[EGF]_{1h}$ y $[EGF]_{4h}$), que constituyen buenos estimadores del EGF circulante y su provisión total en las plaquetas, respectivamente, y que junto a los conteos plaquetarios constituyen las variables primarias; cuya combinación generó otras variables de estudio ($r=[EGF]_{1h}/[EGF]_{4h}$, $d=[EGF]_{4h}-[EGF]_{1h}$, $[EGF]_{1h}/\text{plaquetas/L}$, $d/\text{plaquetas/L}$).

III. RESULTADOS

A. Estuche *UMELISA EGF*[®]

La Figura 1 describe el estuche de cuantificación *UMELISA EGF*[®] desarrollado, (21) basado en un ELISA tipo sándwich. Este juego de reactivos está soportado sobre la plataforma cubana SUMA (Sistema Ultra Micro Analítico) que incluye un lavador de placas MW-2001 y el fotómetro-fluorímetro PR-621 para la lectura de las placas o tiras de reacción.



Fig. 1 Estuche *UMELISA EGF*[®].

En las validaciones del estuche, realizadas por el productor (Centro de Inmunoensayo, CIE) y el Centro de Inmunología Molecular (CIM), se verificó la concordancia entre las cuantificaciones *UMELISA*

EGF[®] y Quantikine[®] Human EGF Immunoassay kit (R&D, EE.UU.), estuche este último que acompañó el desarrollo e inserción de la vacuna CIMAvax-EGF[®] en la práctica clínica. La Tabla 1 resalta en *itálicas* las fortalezas de cada ensayo.

Tabla 1 Comparación entre los estuches *UMELISA EGF[®]* y *Quantikine[®] Human EGF Immunoassay*.

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

B. 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. ⁽²³⁾ Este estudio clasifica como exploratorio, ^(11,24) en los cuales el tamaño de la muestra oscila entre 25 y 200 ^(23,25) y con no poca frecuencia alrededor de 25. No obstante la modesta muestra estudiada, ⁽²²⁾ ésta reproduce en sus aspectos demográficos y clínico-patológicos más importantes la evaluada por Rodríguez y colaboradores, ⁽⁸⁾ con alrededor de 400 pacientes provenientes de 19 sitios clínicos y diferentes provincias del país; por lo que puede considerarse representativa de la variabilidad biológica de los pacientes cubanos.

El estudio reveló que controles sanos y pacientes no tratados (T₀) tienen como promedio igual reserva total de EGF (Figura 2A), medido en muestras colectadas a las 4h ([EGF]_{4h}); lo que sugiere la irrelevancia de la variable en la fisiopatología tumoral. ⁽²²⁾ En tanto 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

($r=[\text{EGF}]_{1h}/[\text{EGF}]_{4h}$) y menos EGF retenido en las plaquetas ($d=[\text{EGF}]_{4h}-[\text{EGF}]_{1h}$) (datos no mostrados).⁽²²⁾ 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.

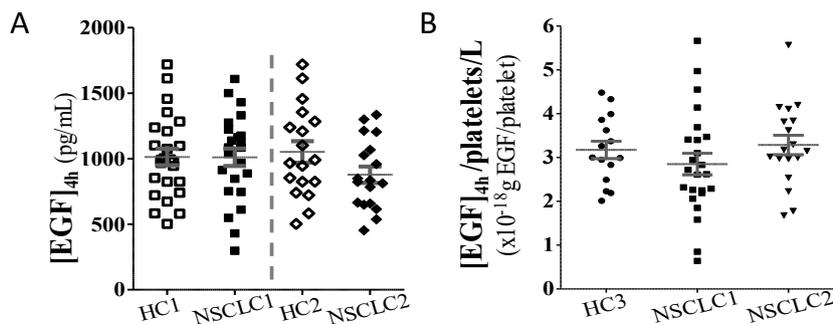


Fig. 2 Concentraciones séricas de EGF medidas a las 4h: pacientes vs. controles sanos. A) Valores absolutos al diagnóstico (NSCLC1) y después de quimio-radioterapia (NSCLC2). controles sanos emparejados por sexo y edad (HC1 y HC2).

B) Análisis similar, para las concentraciones normalizadas (NSCLC1 y NSCLC2 vs. HC3).

De igual manera la normalización por conteo plaquetario, del EGF circulante y del retenido en plaquetas, evidenció más EGF contribuido a la circulación por plaqueta (Figura 3A) y consecuentemente menos EGF retenido también por plaqueta (Figura 3B).

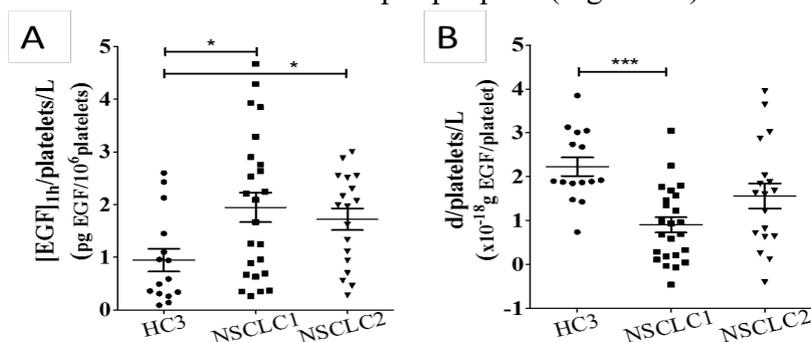


Fig. 3 Comportamiento de las variables normalizadas por conteo plaquetario en pacientes (NSCLC1, NSCLC2) y controles sanos (HC3). (A) $[\text{EGF}]_{1h}/\text{plaquetas}/\text{L}$: HC3 vs. NSCLC1, $p=0,0155$; HC3 vs. NSCLC2, $p=0,0148$. (B) $d/\text{plaquetas}/\text{L}$: HC3 vs. NSCLC1, $p<0,0001$; HC3 vs. NSCLC2, $p=0,0807$.

El análisis de la capacidad discriminatoria de las nuevas variables, realizado por análisis ROC (Tabla 2), reveló que la normalización permite la discriminación de los pacientes incluso después de quimio-radioterapia (T_1), a pesar de que ésta provoca una disminución en los niveles de EGF.⁽²²⁾ Esto indica el mayor vínculo de las variables normalizadas con la biología del tumor, en comparación con el EGF circulante ($[\text{EGF}]_{1h}$) o su stock total ($[\text{EGF}]_{4h}$), 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, aún normalizada por conteo plaquetario (Figura 2B), no discrimina entre pacientes y controles, lo que indica nuevamente su irrelevancia en la fisiología tumoral.⁽²²⁾

Tabla 2 Evaluación de la capacidad discriminatoria de las nuevas variables

Variable	T_0					T_1				
	AUC	p	$C^a (>/<)$	Se^b	Sp^b	AUC	p	$C^a (>/<)$	Se^b	Sp^b
Plaquetas/L	0.8181	0.0009553	302 (^{>})	75	87	-	-	-	-	-
$[EGF]_{1h}$	0.8250	0.0007371	291 (^{>})	83	73	-	-	-	-	-
$r=[EGF]_{1h}/[EGF]_{4h}$	0.8278	0.0006635	0.68 (^{>})	54	100	-	-	-	-	-
$d=[EGF]_{4h}-[EGF]_{1h}$	0.7056	0.0178	239 (^{<})	58	100	-	-	-	-	-
$[EGF]_{1h}/plaquetas/L$	0.7389	0.01308	0.63 (^{>})	83	53	0.7431	0.0071	1.62 (^{>})	64.70	80.00
$d/plaquetas/L$	0.8875	< 0.0001	1.80 (^{<})	92	80	0.7059	0.0349	1.84 (^{<})	70.60	80.00

AUC: Área bajo la curva; $C^{(>/<)}$: Puntos de corte optimizados (los casos por encima/debajo de $C^{>}/C^{<}$, respectivamente); Se: Sensibilidad en %; Sp: Especificidad en %; ^a Expresado en las unidades estándar de cada variable; ^b Valores redondeados

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. 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.

C. Impacto científico, social y económico

La aplicación de la metodología desarrollada permitió esclarecer el valor diagnóstico del EGF, controversial hasta ese momento y explicar algunas limitaciones del biomarcador actual de eficacia de CIMAvax-EGF[®]. Adicionalmente, 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 citosinas y factores de crecimiento igualmente almacenados en las plaquetas (PDGF, TGF β , VEGF), con un impacto análogo en las mediciones y la clínica y a otras patologías en las cuales el protagonismo del EGF ha sido reportado (aterosclerosis, diabetes mellitus, Alzheimer, depresión, autismo, esquizofrenia, entre otros), contribuyendo a una mejor lectura de sus niveles séricos y al aclaramiento de la relación de la molécula con la enfermedad, con beneficio en el manejo de los pacientes.

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 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 aplicación de dichas terapias en las nuevas localizaciones seleccionadas y por tanto la disponibilidad de otras opciones de tratamiento para los pacientes no respondedores a terapias previas.

El estuche *UMELISA EGF*[®], garantiza soberanía tecnológica y permite el ahorro de divisas por concepto de importaciones. El empleado anteriormente, de procedencia norteamericana, tiene un elevado precio en el mercado. La aplicación racional de la vacuna en los pacientes cubanos, además de beneficio clínico, implica un ahorro económico para el país. 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.

IV. 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. Pacientes y controles sanos tienen en promedio igual stock de EGF, pero los pacientes tienen más EGF en circulación como promedio. Además, mientras que la literatura reporta concentraciones absolutas de EGF sérico, el estudio propone su corrección por el EGF total expresado y/o por el recuento de plaquetas. El ajuste se logra en variables como r ($[EGF]_{1h}/[EGF]_{4h}$, la fracción que representa el EGF circulante del total) y d ($[EGF]_{4h}-[EGF]_{1h}$, la cantidad estimada de EGF retenido en las plaquetas), así como 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 discriminativa de las nuevas medidas sugiere su mayor relación con la biología tumoral y por tanto, su mayor eficacia como biomarcador. La identificación de posibles predictores séricos de respuesta a CIMAvax-EGF[®] es clínicamente relevante. La mayoría de los biomarcadores de eficacia empleados en oncología 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.

Los biomarcadores propuestos, validados clínicamente, podrían apoyar la indicación personalizada de CIMAvax-EGF[®] en primera línea, en función de su positividad como ocurre con otras terapias dirigidas. La vacuna contrasta con tratamientos no específicos y agresivos como la quimioterapia y/o radioterapia, que pueden comprometer el estado inmunológico de los pacientes. La aplicación de CIMAvax-EGF[®] en dicho escenario potenciaría su efecto, dependiente 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

- (1) Global Cancer Observatory. International Agency for Research on Cancer. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/> (Revisado: Abril 29, 2022).
- (2) Dirección de Registros Médicos, Ministerio de Salud Pública de Cuba, La Habana. Anuario Estadístico de Salud 2019. 2020.
- (3) 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.
- (4) 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.
- (5) 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.
- (6) Lam S, Tammemagi M. Contemporary issues in the implementation of lung cancer screening. *Eur Respir Rev*. 2021;30(161).
- (7) Seijo LM, Trujillo JC, Zulueta JJ. Cribado en cáncer de pulmón: últimas evidencias. *Arch*.

bronconeumol.(Ed. impr.). 2020;7-8.

- (8) Rodriguez 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.
- (9) Crombet Ramos T, Neningen E, Gonzalez J, Rodriguez PC, Garcia B, Popa X, et al. EGF-based cancer vaccine: Optimizing predictive and surrogate biomarkers. ASCO; 2013.
- (10) Crombet Ramos T, Rodríguez PC, Neningen Vinageras E, Garcia 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.
- (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.
- (12) Lemos-Gonzalez Y, Rodriguez-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.
- (13) Blanco-Prieto S, Vazquez-Iglesias L, Rodriguez-Girondo M, Barcia-Castro L, Fernandez-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.
- (14) Oka Y, Orth D. Human plasma epidermal growth factor/betaurogastrone is associated with blood platelets. *J Clin Invest.* 1983;72(1):249-59.
- (15) 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.
- (16) González-Pérez, I., Cáceres Lavernia, H. H., Carr 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.
- (17) 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.
- (18) 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.
- (19) 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.
- (20) Luaces P, Sanchez 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.
- (21) 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.
- (22) González-Pérez, I, Cáceres, H, Camilo P, Carr A, León K. 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.
- (23) Perez-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.
- (24) Xia J, Broadhurst DI, Wilson M, Wishart DS. Translational biomarker discovery in clinical metabolomics: an introductory tutorial. *Metabolomics* 2013;9(2):280-99.
- (25) Wallstrom G, Anderson K, LaBaer J. Biomarker Discovery for Heterogeneous Diseases. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2013;22:1-17.