



## Factor de crecimiento epidérmico en pacientes con COVID-19 grave: aproximación inicial

Dr. Héctor José Pérez Hernández<sup>1</sup>, Dra. Ana Laura Añé Kouri<sup>2</sup>, Dra. C. Danay Saavedra Hernández<sup>3</sup>, Dra. C. Amparo Macías Abraham<sup>4</sup>, Dra. C. Tania Crombet Ramos<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba, hectorj@cim.sld.cu

<sup>2</sup> Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba, analaura@cim.sld.cu

<sup>3</sup> Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba, danay@cim.sld.cu

<sup>4</sup> Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba, amparo@cim.sld.cu

<sup>5</sup> Centro de Inmunología Molecular, La Habana, Cuba, taniac@cim.sld.cu

### Resumen:

**Introducción:** La COVID-19 ha sido un reto de colosas envergadura para los sistemas de salud. La comprensión de los nexos COVID-inflamación es un punto crítico en el desarrollo de nuevos conocimientos, como base del diseño de estrategias terapéuticas racionales y eficientes.

**Objetivo:** Describir el comportamiento de los niveles séricos de EGF en pacientes adultos con COVID-19 grave.

**Método:** Estudio observacional analítico, en pacientes con COVID-19 grave ingresado en las unidades especializadas del MINSAP durante la segunda ola pandémica en Cuba.

**Resultados:** Grupo estudio ( $n_1=32$ ) con relación según sexo de 1:1, con edad promedio de  $68.7 \pm 4.79$  años [49-94]; grupo control ( $n_2 = 27$ ) con una relación 0.9:1 en discreto favor del sexo femenino, con edad promedio de  $51.78 \pm 2.08$  años [41-62]. Las diferencias en la media de EGF de pacientes con COVID-19 vs controles no alcanzan la significación estadística ( $F=0.9399$ ;  $p=0.3179$ ); sin embargo, se observó un tamaño de efecto de moderada intensidad ( $d=0.6603$ ). En el sexo femenino se evidenciaron diferencias significativas vs control (dif.=45 pg/mL;  $t=2,0649$ ;  $p=0,0490$ ), con un tamaño de efecto moderado ( $d=0.5756$ ); con una dispersión importante de datos en el grupo de mujeres con COVID-19 grave, respecto a los controles sanos. El análisis de iconografía de correlaciones notables se evidenciaron correlatos de forma general solo para la relación Edad-EGF con sentido de dependencia negativo, que en el análisis según sexos reflejo una diferencia 1.25 veces superior en mujeres respecto a hombres.

**Conclusiones:** Existen observables diferencias según sexo y edad entre estratos y

respecto a los controles, con tamaños de efecto moderado en ambos casos, más marcadas en el sexo masculino, en el contexto de una tendencia general a una reducción de las concentraciones séricas de EGF en relación a la gravedad respecto a los sujetos sanos.

**Palabras clave:** COVID-19 grave, EGF e inflamación, EGF y COVID-19.

## **INTRODUCCIÓN**

La propagación mundial del nuevo coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2) ha condicionado una de las mayores crisis sanitarias a escala internacional. A pesar de ser las vacunas herramientas críticas para controlar la pandemia de la enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19), la aparición de variantes del coronavirus 2 del síndrome respiratorio agudo severo (SARS-CoV-2), así como las inequidades en la distribución de las vacunas y el cada vez más fortalecido efecto de los movimientos anti-vacuna han amenazado su control efectivo, constituyendo aun a día de hoy todo un reto sanitario. (1)

La identificación reciente de factores asociados al aumento de la morbilidad de COVID-19, como la edad adulta, incluida la vejez, el sexo masculino, las comorbilidades preexistentes y las disparidades raciales / étnicas, de la mano de la exploración molecular los cambios en los índices de laboratorio y las citoquinas proinflamatorias, han jugado un papel crítico en la predictibilidad de las posibles complicaciones y la progresión de COVID-19 a una etapa grave y crítica. (2) Independiente de ello, y a la vez como factor común enlazador de relevancia crucial en la progresión de la enfermedad encontramos a la inflamación y sus efectos. (3)

En relación con la COVID-19, la señalización mediada por EGFR parece jugar un rol significativo, con un impacto potencial en su mortalidad.(4,5) La activación de la vía EGFR no solo media en los procesos crecimiento, la supervivencia y la migración celular, sus mediadores intracelulares como las proteínas transductoras RAS / RAF / MEK / ERK, PI3K / AKT y JAK / STAT3, son también importantes mediadores de la respuesta inflamatoria en humanos.6,7,8

Entre los ligandos que se expresan asociados a las membranas celulares y son activados por proteólisis enzimática la molécula EGF(9,10,11,12,13) destaca como su ligando canónico. Esta ampliamente documentado como EGF, tal factor de crecimiento, puede activar la síntesis de ADN, la proliferación celular y estimular la mitogénesis en el tejido epidérmico, además de participar en la angiogénesis del tejido epidérmico, así como existe abundante evidencia en base a estudios moleculares que relacionan su sobreexpresión la diferenciación y proliferación celular acelerada, la inhibición de la apoptosis y la mejorar de la capacidad de invasividad en las células cancerosas en muchos tipos de tumores epiteliales.(14,15,16)

El estudio de la neumonitis en el contexto del NSCLC, ha evidenciado como en pacientes que reciben quimioterapia (modalidad postneoadyuvante) se experimenta un incremento de los niveles de EGF así como otras citocinas pro-inflamatorias, efecto este diferencial respecto a la propia inflamación parenquimatosa del pulmón, puesto los muestreos en pacientes sin focos de neumonitis mostraban niveles significativamente menores tanto de citocinas pro-inflamatorias como de EGF.(17) Lo que sumado a lo antes expuesto redefine el papel del EGF solo como un factor de

crecimiento tradicional, y lo posiciona como una molécula enlazadora crítica entre la inflamación, la génesis del cáncer y su progresión.

Más recientemente, los análisis de secuenciación de ARN (RNA-seq), informan una expresión diferencial de esta molécula entre el sistema respiratorio respecto a los PNN, favoreciendo la inferencia de un interesante link molecular con estas células críticas para la inflamación, donde se ha observado como por cada 1.000.000 de moléculas de ARN en la muestra de RNA-seq, 0.5 provienen de este gen transcripto en el sistema respiratorio (0.5 nTPM) muy similar a lo que se observa para PNN (0.5 nTPM). Esta expresión de EGF en PNN es característica del cluster no.1 de estos leucocitos por análisis transcriptómico, que además expresa una con la expresión de la proteína AZU1(18) en dicha célula recientemente asociada al incremento del riesgo de desarrollo por cáncer de pulmón asociado a la infección por SARS-COV-2, proteína que además se encuentra elevada en los adenocarcinomas conjuntamente con ACE2, CXCL9, MMP12 e IL6(19).

También más directamente asociado al rol del ligando EGF, es mandatorio señalar como estudios de actividad celular, en sobrenadantes de cultivo de PBMC de pacientes con EPOC inducida por tabaquismo, se ha demostrado que los PBMC estimulados con EGF, pero no previamente tratados con Ac anti-CD3 y anti-CD-28, las concentraciones de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  o GM-CSF estuvieron casi siempre por debajo del límite de detección del ELISA, pero cuando estos PBMC fueron estimulados se observó un incremento en las concentraciones de IFN $\gamma$  y GM-CSF, observada exclusivamente en fumadores y pacientes de EPOC, lo que permitió concluir a los investigadores que el aumento de las concentraciones de EGF resultó claramente en un aumento de los efectos supresores de células T.(20)

De ahí que una mejor comprensión de la inflamación y los mecanismos de nexos que la relacionan con la señalización dependiente del ligando de EGFR se constituye en un tema de investigación necesario, escalonando progresivamente en las técnicas de estudio para una comprensión dinámica y eficiente de su significación en el contexto de la COVID-19 en particular, así como los posibles nexos al resto de las neumopatías inflamatorias, aplicable en la práctica médica bien en la toma de decisiones de conducción clínica y/o orden terapéutico; lo cual nos conduce en una aproximación inicial, a describir el comportamiento de los niveles séricos de EGF en pacientes adultos con COVID-19 grave.

## **MÉTODO**

Estudio observacional transversal con análisis comparativo contra control, en pacientes ingresados en las unidades de vigilancia intensivas del MINSAP con diagnóstico virológico confirmatorio por PCR-RT de neumonía por SARS-CoV-2, seleccionando una muestra representativa con cuotas balanceadas según sexo, en función al reporte de grave al momento del ingreso en el servicio, mediante un muestreo aleatorio simple con una discontinuidad temporal leve. La estructuración del grupo de controles se realizó en base a un muestreo aleatorio simple en sujetos donantes de banco de sangre y otros pesquisados en atención primaria de salud y reportados como aparentemente sanos.

Se realizaron extracciones de 5 cc de sangre total, por venopunción de la vena cefálica, siendo depositada en un tubo de polipropileno de 15 cc de volumen total, y

colocados en una gradilla de forma horizontal en baño maría a 37 °C durante 4 horas luego de lo cual se centrifugó a 3500 RPM durante 15 minutos, decantando posteriormente el suero sobrenadante, que fue depositado en tubos de microcentrifugada de la marca comercial Eppendorf de volumen total de 1,5 mL; un volumen de 1500 µL de suero en un tubo y 600 µL de suero del mismo origen en otro tubo, congelándolos a -20 °C y destinado el de menor volumen para un primer análisis, reservando el otro para posteriores análisis.

Como método analítico se emplearon los kits comerciales de UMELISA-EGF, de tecnología SUMA, producidos y comercializados por el Centro de Inmunoensayos de Cuba, en los laboratorios certificados de los Hospitales Juan Bruno Zayas de Santiago de Cuba y Hermanos Ameijeiras de la Habana; aplicando las recomendaciones del fabricante. Los resultados del ensayo enzimático se expresaron en pg/ml. Como variables de control principales se registraron la edad, el sexo y el estado clínico de reporte.

Los datos clínicos fueron recuperados de las Historias Clínicas y organizados en una base de datos digital utilizando los servicios de la plataforma de cálculo Excel de Microsoft Office. Para la descripción estadística se emplearon como medidas de resumen la media aritmética, la mediana, como parámetros de tendencia central; la desviación estándar y varianza como medidas de dispersión, así como otros coeficientes de simetría y correlación lineal; para el resumen de los aspectos cualitativos los resultados se expresaron en porcentaje. En el análisis estadístico se emplearon medios gráficos y computacionales para la determinación de la normalidad en la distribución de los datos, así como para la exploración de la significación estadística se emplearon el test de Fischer, la prueba U de Mann-Whitney y t de Student asumiendo que  $\alpha=0.05$ , así como la D de Cohen y la g de Hedges para la estimación del tamaño de efecto.

Cabe señalar que, atendido a los estudios de simulación realizados y reportados en la literatura, se emplearon procedimiento paramétrico en determinados análisis de datos, sobre la base demostrada de que aun cuando la población no esté distribuida normalmente si el tamaño de la muestra es lo suficientemente grande y guarda representatividad de la población de partida.(21)

Tanto para la obtención de muestras biológicas y datos clínicamente relevantes de los pacientes y sujetos de los grupos de estudio y control, se observaron y cumplieron los principios y normativas contenidos en el Código de ética médica de Núremberg (1947), la Declaración de Ginebra (1948), la Declaración de Helsinki (1964) y las recomendaciones respecto a buenas prácticas clínicas de las Conferencia Internacional sobre armonización de requisitos técnicos para el registro de productos farmacéuticos para uso humano.

## **RESULTADOS/ PRESENTACIÓN DEL CASO/DESARROLLO**

### **Características generales de la muestra de estudio:**

El grupo de estudio estuvo integrado por 32 pacientes reportados de graves, con diagnóstico virológico confirmatorio para SARS-CoV-2, con una relación según sexo

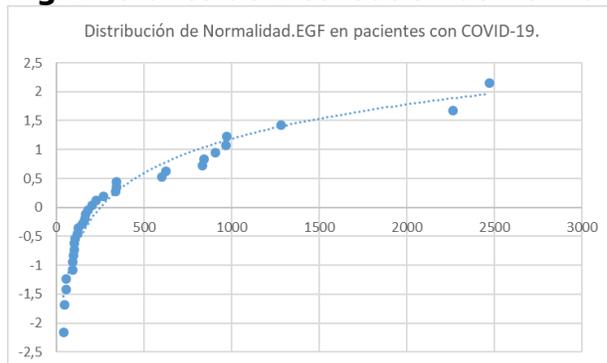
de 1:1, en un rango de edad general [49;94] años de edad, con un promedio de  $68.7 \pm 4.79$  años, con una mediana de 68 años, con un  $JB=1,7504$ ;  $p= 0,4167$ , evidenciando una normalidad en la distribución de forma general. Respecto al sexo masculino el rango de edad fue [50;94] años, con una edad promedio de  $69.75 \pm 6,62$  años, con una mediana igual a la general, con una  $JB=0,6008$ ;  $p=0,7405$ , evidenciando una distribución normal de los datos. Respecto al sexo femenino el rango de edad fue [49;92] años, con una edad promedio de  $67.56 \pm 7,09$  años, con una mediana igual a la general, con una  $JB=1,3094$ ;  $p=0,5195$ , evidenciando similar distribución.

El grupo control estuvo conformado por padrón de 27 sujetos con antecedentes aparentes de salud, con una relación según sexo de 0.9:1 en muy discreto favor del sexo femenino, en un rango de edad general [41;62] años de edad, con un promedio de  $51.78 \pm 2.08$  años y una mediana de 52 años, con un  $JB= 1,0389$ ;  $p= 0,5948$ , evidenciando una normalidad en la distribución de forma general. Respecto al sexo masculino el rango de edad fue [48;58] años, con una edad promedio de  $53.42 \pm 1.87$  años, con una mediana de 55 años, con una  $JB=1.7739$ ;  $p=0.4118$ , evidenciando una distribución normal de los datos. Respecto al sexo femenino el rango de edad fue [41;62] años, con una edad promedio de  $50.00 \pm 3,68$  años, con una mediana de 50 años, con una  $JB=0,9268$ ;  $p=0,6291$ , evidenciando similar distribución.

Existe una homogénea distribución entre sexos ( $X^2= 1,0297$ ;  $p=0,9585$ ), con diferencias significativas respecto a la distribución etaria ( $t= 6,3317$ ;  $p=0,000^*$ ); mas no se considera un sesgo crítico y/o relevante para la finalidad del estudio, puesto en primer lugar el tamaño de efecto fue mínimo ( $g=0.2029$ ), así como tampoco existe confirmación de una desigual distribución del EGF a partir de los 40 años de edad, con reportes en la literatura que evidencian una desigual y significativa distribución en relación a los 30 años, y más pronunciada en la niñez respecto a la senectud,<sup>(22,23)</sup> como lo evidencia los resultados de los equipos de los doctores Sarang Meybosch (University of Antwerp, Bélgica) e Indira González (Center of Molecular Immunology, Cuba), respectivamente.

### Caracterización descriptiva básica del grupo en estudio:

**Fig.1:** Gráfico de Distribución de Normalidad general.



Fuente: Base de datos.

En la muestra estudiada, el análisis de normalidad de los niveles séricos de EGF reflejo signos de una distribución que no cumple los criterios de normalidad ( $JB=55,23$ ;  $p=0.0101^{-10}$ ), claramente reflejado en el gráfico de distribución de normalidad (Fig. 1).

Los análisis según sexo no arrojaron resultados diferentes, con signos de asimetría para ambos sexos, solo alcanzado significación estadística en el sexo masculino ( $JB_{mujeres}=2,0395$ ;  $p=0,3606$  /  $JB_{hombres}=21,9975$ ;  $p=0.0167-4$ ).

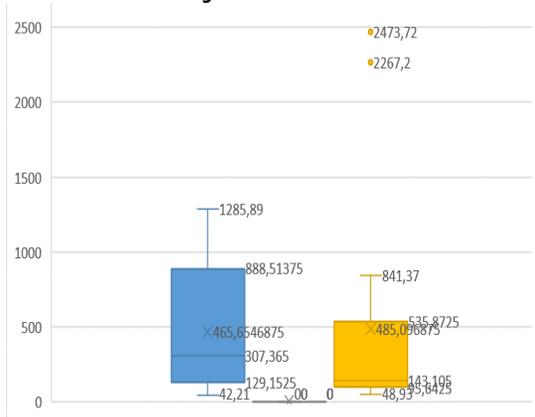
Los análisis según edad, tomando como referencia para la estratificación la edad de 65 años, evidenciaron similar comportamiento al descrito en el sexo, con signos de distribución no normal para ambos estratos, solo con significación estadística en los mayores de 65 años de edad. ( $JB_{\leq 65 años}=3,5404$ ;  $p=0,1702$  /  $JB_{>65 años}=8,4229$ ;  $p=0.0148$ ).

De forma general, ajustando los parámetros por exclusión de parámetros atípicos, se observó que de forma general la media de EGF fue de  $349,03 \pm 125.74$  pg/mL, con una mediana  $172,74$  pg/mL, con una desviación típica de  $351,38$  pg/mL, con Curtosis =  $0,4229$  y un coeficiente de asimetría =  $1,2688$ ; en un rango de valores  $[42,21;1285,89]$  pg/mL ( $m1=30$ ).

En el sexo masculino, por presentar valores atípicos, fueron recalculados los parámetros y ajustada, obteniéndose que la media de EGF fue de  $215,75 \pm 121.45$  pg/mL, con una mediana  $115,515$  pg/mL, con una desviación típica de  $231,86$  pg/mL, con Curtosis =  $3,7079$  y un coeficiente de asimetría =  $2,0471688$ ; en un rango de valores  $[48,93;841,37]$  pg/mL ( $m1=14$ ).

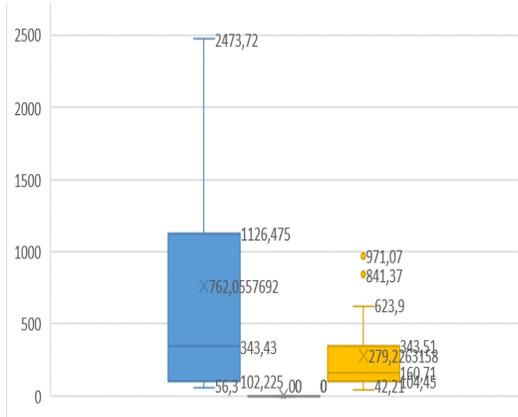
En el grupo de mayores de 65 años, por similares motivos que en el sexo masculino fueron recalculados los parámetros y ajustada, obteniéndose que la media de EGF fue de  $205,46 \pm 83.67$  pg/mL, con una mediana  $147.07$  pg/mL, con una desviación típica de  $176,01$  pg/mL, con Curtosis =  $1,8538$  y un coeficiente de asimetría =  $1,6110$ ; en un rango de valores  $[42,21;623,9]$  pg/mL ( $m1=17$ ).

**Fig.2.** Niveles séricos de EGF: hombres vs mujeres.



Fuente: Base de datos.

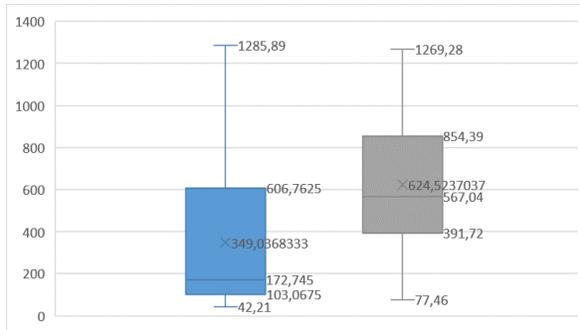
**Fig.3.** Niveles séricos de EGF:  $\leq 65$  años vs  $>65$  años.



Fuente: Base de datos.

**Análisis general de los datos procesados:**

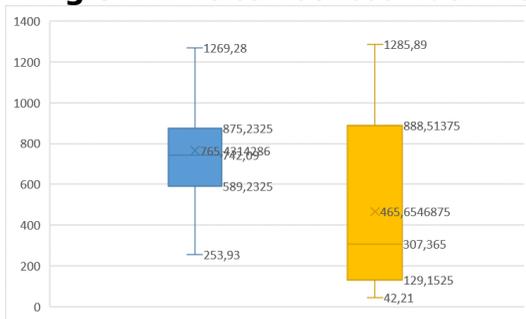
**Fig.4.** Niveles séricos de EGF: COVID-19 vs Control.



Fuente: Base de datos.

La muestra de sujetos COVID ajustada mantiene de forma general una distribución distinta de la normal ( $JB=8,2733$ ;  $p=0,0159$ ), comparativamente contra sujetos sano se observan diferencias en la media de los datos, a pesar de lo cual según los resultados del test U de Mann-Whitney ( $U=810$ ;  $p=1$ ) y del test de Fisher ( $F=0.9399$ ;  $p=0.3179$ ) estas no alcanzan la significación estadística; sin embargo al realizar el test D de Cohan para evaluar el tamaño del efecto observado se constata una diferencia moderada entre las medias de forma general ( $d=0.6603$ ).

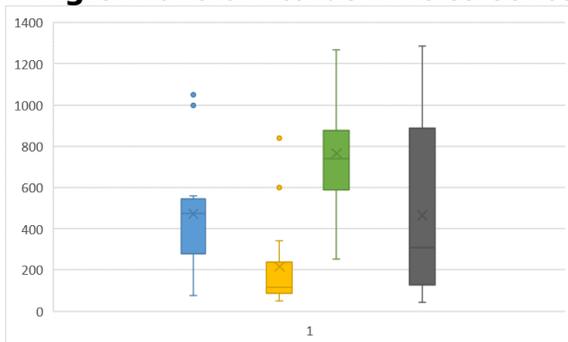
**Fig.5.** Niveles séricos de EGF: COVID-19 vs Control (Sexo femenino).



Fuente: Base de daos.

La comparación de las muestras de mujeres con COVID respecto a los controles (solo mujeres sanas), en principio aparenta diferencias importantes, con un tamaño de efecto moderado ( $D=0.5756$ ), sin embargo, las mismas no son significativas teniendo como referencia los valores establecidos como elevados para EGF ( $F=0,8714$ ;  $p=0,6943$ ) solo alcanzan la significación estadística con una diferencia de 45 pg/mL ( $t=2,0649$ ;  $p=0,0490$ ); se observó una dispersión importante de datos en el grupo de mujeres con COVID-19 grave, respecto a los controles sanos.

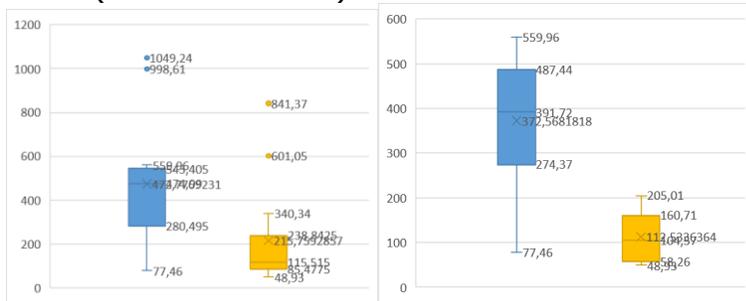
**Fig.6.** Panorámica de Niveles séricos de EGF: COVID-19 vs Control, según sexo.



Fuente: Base de datos.

En el caso del sexo masculino se observaron diferencias significativas tanto en los controles como en los pacientes enfermos, respecto al comportamiento en el sexo femenino, así como a diferencia de este la presencia de valores atípicos. Con la finalidad de minimizar la interferencia por los datos atípicos incorporados estos fueron eliminados para el análisis estadístico y normaliza la distribución de los datos, que permitió un recalcu ajustado de los parámetros estadísticos como se observa (Fig.7).

**Fig.7.** Niveles séricos de EGF antes y después del ajuste de datos: COVID-19 vs Control (Sexo masculino).



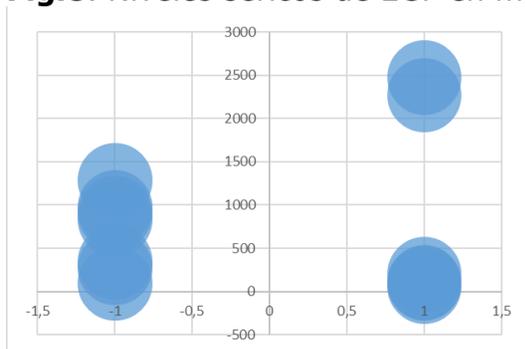
Fuente: Base de datos.

Se demostró para este conjunto de datos que existe una diferencia de 150 pg/mL de EGF en los controles sanos respecto a los pacientes con COVID-19 ( $t=2.3187$ ;  $p=0.038$ ) con un tamaño de efecto corregido grande, indicativo de que los dos grupos difieren en 1.5902 desviaciones estándar.

El tamaño de la muestra estudiada limita la extrapolabilidad eficiente de las tendencias o patrones describibles, debido a una desigual distribución de los tamaños de las muestras derivadas, por lo cual no se comentan a profundidad en este estudio.

A pesar de que, en el grupo de menores de 65 años de edad, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el sexo y los valores elevados de EGF ( $F=0,7683$ ;  $p=1,4079$ ), la observación del posicionamiento de los valores en una gráfica de burbuja, observamos una clara tendencia a la concreción de estos datos en mujeres, respecto a una especie de clusterización donde los hombres se dividen en dos grupos no continuos, uno con valores muy inferiores a 500 pg/mL y otros con valores superiores a 2000 pg/mL; algo similar también se hace evidente si observamos el gráfico no.6 .

**Fig.8.** Niveles séricos de EGF en menores de 65 años: COVID-19 según sexo.



Fuente: Base de datos.

En la exploración por iconografía de correlaciones notables se evidenciaron correlatos de forma general solo para la relación Edad-EGF, con un sentido negativo de la dependencia, lo cual se observó nuevamente en el análisis según sexos, con una correlación negativa 1.25 veces superior en mujeres respecto a hombres; en el análisis en función de la edad no se evidenciaron correlatos notables entre las variables, solo con una ligera aproximación en el caso de la relación Sexo-Edad.

## DISCUSIÓN

La molécula EGF es una proteína con una importante y conocida función en la biología de los fibroblastos y células epiteliales,<sup>(24)</sup> así como un rol crucial en el desarrollo del sistema digestivo desde el periodo embrionario de vida.<sup>(25,26)</sup> Comúnmente se ha asociado su biodistribución mayormente con las plaquetas, a pesar de lo cual esta hipótesis carece de sólido respaldo experimental.

Los análisis transcriciomicos apuntan a una muy intensa actividad a nivel renal (30 pTPM) y más balanceada en el resto de los tejidos y células de nuestro organismo (3 pTPM) con pequeños picos levemente superiores a 3 pTPM a nivel del musculo esquelético y los ganglios ciliares, trisemanales y cervicales superiores; todo esto en condiciones basales del organismo.<sup>(27)</sup>

Su función conocida como ligando restringido y canónico del receptor HER-1, la han convertido en una diana terapéutica en determinadas patologías oncológicas como el cáncer de pulmón, a pesar de lo cual se conoce poco sobre su biología básica y la existencia de otras funciones más allá de las dependiente de su interacción HER-1.<sup>(28)</sup>

Los estudios que exploren los valores séricos de EGF son escasos en la literatura internacional de forma general, y en especial en relación a sujetos aparentemente sanos. Sarang Meybosch y colaboradores han reportado una disminución progresiva de los valores de EGF a medida que se avanza en edad, con diferencias entre sexos que ganan en categoría a partir de la adolescencia; reportando para sujetos en un rango etario de 30-50 años (n=16) valores promedio de 209 pg/mL [2-314 pg/mL] y en mayores de 50 años(n=16) valores promedio de 76 pg/mL [17-337 pg/mL]<sup>(22)</sup>. Estos resultados son muy diferentes a los reportados por Gonzalez-Perez I y colaboradores, que reportan para sujetos en similares rangos de edad valores promedio de  $1012.00 \pm 41.85$  pg/mL (n=37)<sup>(23)</sup>. Los datos de ambos estudios igualmente difieren de lo observado en nuestros sujetos controles con un promedio de 624.57 pg/mL (n=27) con un rango de valores de 77.46 – 1269,28 pg/mL. A pesar que a priori no existe una razón consistente que explique las diferencias notables obtenidas observadas en entre estos sujetos en apariencia equiparables, nuestros resultados además de responder a una distribución normal, son estrechamente cercanos (sin diferencias) a lo reportado por la base de datos de Proteínas Humanas para EGF (680 pg/ml)<sup>(29)</sup>, lo cual aporta una validez externa a nuestro control sobre la base de un valor internacionalmente reconocido por la comunidad científica, e indirectamente al método de evaluación empleado.

A excepción de los resultados reportados por Sarang Meybosch y colaboradores, los resultados obtenidos en nuestro estudio reflejan valores de EGF en pacientes graves de COVID-19 inferiores a los valores de sujetos sanos reportados en la literatura y al propio valor del grupo control, diferencias que en el caso particular del estudio no logra una significación estadística respecto al control en parte

atribuible a la gran dispersión observada en los datos, dispersión comúnmente observada en los estudios que reportaron en sus resultados los rangos de valores de EGF obtenidos.

De forma general se observa en nuestros resultados que se replican las tendencias hasta ahora reportada por el resto de los estudios consultados, de mayores valores de EGF en mujeres respecto a hombres, así como una disminución progresiva de estos a medida que se gana en edad.

Particularmente en el caso del sexo femenino Ina Mathilde Kjær y colaboradores han reportado para mujeres sanas en un rango de edades de 26- 55 años valores promedio de 785 pg/mL con un CA=5.6, y de 610 pg/mL con un CA=10.02 en mujeres de 55-78 años de edad <sup>(30)</sup>, mientras que para similar grupo en los datos reportados por González-Pérez I y colaboradores el promedio observado es de 968.80 pg/mL <sup>(23)</sup>; lo cual al ser comparado con nuestro grupo de mujeres con COVID-19, en un rango de edad similar al segundo grupo de datos comentados del reporte de Ina Mathilde Kjær, con un promedio de 765,43 pg/ml y un CA=4.99 <sup>(30)</sup>, es claramente diferente: mayor en comparación con lo reportado en el estudio danés y coherente con lo resultante de la comparación con el grupo control (465,65 pg/ml), y menor en contraste con los datos en población cubana femenina de González-Pérez.

En escaso de sexo masculino se reportaron valores considerablemente bajos en relación al sexo femenino tanto para pacientes con COVID-19 como para los sujetos del grupo control, con mayores diferencias entre grupos que las observadas discretamente en el sexo femenino (45 pg/ml vs 150 pg/ml) pero que sin embargo cuando se comparan con las reportadas en el estudio de González-Pérez reflejan una tendencia aún más marcada en cuanto a las diferencias tanto respecto a pacientes con COVID como respecto a sujetos del grupo control.

Cabe señalar que no existen estudios formales que definan una relación sólida entre el EGF y la inflamación, y como tal aun en estudios que exploren el rol del EGFR en determinadas patologías, es sistemáticamente raro encontrar datos respecto al comportamiento de EGF; en la mayoría de los estudios que exploran la participación del EGFR en disímiles contextos, la asociación se explora y establece con otros ligando como la anfiregulina y el TGF- $\alpha$ , siendo culposamente ignorado el posible rol de su ligando canónico.

Estudios recientes en el contexto de la COVID-19 han reportado correlatos positivos entre la concentración plasmática de EGF y varias citosinas, particularmente con las citoquinas pro-inflamatorias clásicas como IL-1 $\beta$ , IL-8, MIP-1 $\alpha$  (CCL3), así como citoquinas asociadas a la polarización Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) y Th17 (IL-17A, IL-17F, IL-17E / IL-25 e IL-22).<sup>(31)</sup>

Se ha reportado como los niveles plasmáticos de EGF se correlacionan positivamente tanto con los niveles de PCR ( $r > 0.5$ ) como con la lesión pulmonar por neumonía caracterizada por tomografía computarizada (TC) ( $r > 0.4$ ) y en menor medida pero notablemente con la concentración de plaquetas ( $r > 0.3$ ), las cuales a su vez se relacionaron significativamente con importantes células y citosinas inflamatorias, remarcando los correlatos positivos con los monocitos y neutrófilos ( $r > 0.6$ ) y en menor medida con los linfocitos, similar al correlato de EGF con PCR; siendo notorio un correlato negativo con las concentraciones de IL-10.<sup>(31)</sup>

En un estudio de proteómica que exploró la relación de determinadas moléculas y su contribución con la gravedad de la enfermedad, comparativamente con sepsis y

la gripe como modelo alternativo de neumo-inflamación, sobre un modelos de análisis de red nodal, se observó en relación entre valores de EGF séricos más altos en pacientes con COVID-19 grave; si bien siendo las diferencias de la respuesta proteómica circulante compartida, diferencias específica involucraron los valores de EGF.<sup>(32)</sup>

No obstante resultados de Madè A y colaboradores han reportado resultados diferentes a los ya referidos, observando en muestras de plasma de sujetos con COVID-19 diferencias ( $p < 0.005$ ) entre pacientes críticos y no críticos, con mayores valores en relación a una menor gravedad ( $452 \pm 43.67$  pg/mL vs  $258 \pm 25.99$  pg/mL)<sup>(33)</sup>. Nuestros resultados en pacientes graves muestran valores diferentes a los reportados por Madè A y colaboradores, a pesar de lo cual son comúnmente inferiores a lo reportado para sujetos sanos, tomando como estándar los resultados de nuestro control equiparables a los del valor promedio reportado en el Atlas de Proteínas humanos.

A consideraciones de los autores, las diferencias observadas en los valores de EGF, aunque salvan la reproducibilidad de las tendencias observadas en un contexto general según edad y sexo, en función de los estudios consultados, pueden deberse a variaciones en el procedimiento de obtención de muestras y no así a diferencias en las tecnologías empeladas, las cuales fueron compatibles tanto en la plataforma técnica en si, como en el sistema de expresión de resultados empleados.

La superficial exploración del estudio de la variabilidad de los valores de EGF, en función a posibles correlatos con otras moléculas y células, en el contexto de sujetos sanos; así como la no existencia de estudios profundos en condiciones patológicas específicas, se constituye en una limitación importante para la mejor comprensión del rol del EGF más allá de los poco ilustrativos reportes existentes y de os nexos inferibles sobre del análisis de la información preclínica existente.

Se constituye como principal limitación de este estudio el tamaño muestral, el cual, si bien ofrece la posibilidad de un análisis estadístico suficiente de forma general, carece de una robustez estadística para análisis más específicos entre subgrupos de estudio, así como el hecho de que su realización en condiciones de pandemia limito sensiblemente la exploración de otras variables analísticas relevantes, debido al colapso experimentado por el sistema de salud durante el periodo de ejecución del estudio.

A pesar de lo cual, es importante señalar que similar a lo reportado en la literatura, en relación al posible rol del EGF en la COVID-19, los resultados tanto en hombres como mujeres son diferencialmente mayores en sujetos con COVID-19 respecto a sus respectivos controles; lo cual, sumado a la evidencia experimental disponible, sustenta como hipótesis lógica que EGF puede desempeñar un rol critico en el desarrollo de formas graves de neumonía por COVID-19.

## **CONCLUSIONES**

Existen observables diferencias según sexo y edad entre estratos y respecto a los controles, con significación estadística de 45 pg/mL de EGF para mujeres respecto a 150 pg/mL de EGF para los hombres, con tamaños de efecto moderado en ambos casos, en el contexto de una tendencia general a una reducción de las concentraciones séricas de EGF en relación a la gravedad respecto a los sujetos sanos.

## REFERENCIAS

1. Fiolet T, Kherabi Y, MacDonald CJ, Ghosn J, Peiffer-Smadja N. Comparing COVID-19 vaccines for their characteristics, efficacy and effectiveness against SARS-CoV-2 and variants of concern: a narrative review. *Clin Microbiol Infect.* 2022 Feb;28(2):202-221. doi: 10.1016/j.cmi.2021.10.005. Epub 2021 Oct 27. PMID: 34715347; PMCID: PMC8548286.
2. Zhang JJ, Dong X, Liu GH, Gao YD. Risk and Protective Factors for COVID-19 Morbidity, Severity, and Mortality. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2023 Feb;64(1):90-107. doi: 10.1007/s12016-022-08921-5. Epub 2022 Jan 19. PMID: 35044620; PMCID: PMC8767775.
3. Shishido AA, Barnes AH, Narayanan S, Chua JV. COVID-19 Vaccines-All You Want to Know. *Semin Respir Crit Care Med.* 2023 Feb;44(1):143-172. doi: 10.1055/s-0042-1759779. Epub 2023 Jan 16. PMID: 36646092.
4. Zhao C, Yang L, Zhou F, Yu Y, Du X, Xiang Y, Li C, Huang X, Xie C, Liu Z, Lin J, Wang L, Liang G, Cui R. Feedback activation of EGFR is the main cause for STAT3 inhibition-irresponsiveness in pancreatic cancer cells. *Oncogene.* 2020 May;39(20):3997-4013. doi: 10.1038/s41388-020-1271-y. Epub 2020 Apr 2. PMID: 32242147
5. Wang S, Qiu Z, Hou Y, Deng X, Xu W, Zheng T, Wu P, Xie S, Bian W, Zhang C, Sun Z, Liu K, Shan C, Lin A, Jiang S, Xie Y, Zhou Q, Lu L, Huang J, Li X. AXL is a candidate receptor for SARS-CoV-2 that promotes infection of pulmonary and bronchial epithelial cells. *Cell Res.* 2021 Feb;31(2):126-140. doi: 10.1038/s41422-020-00460-y. Epub 2021 Jan 8. PMID: 33420426; PMCID: PMC7791157
6. Roskoski R. Small molecule inhibitors targeting the EGFR/ErbB family of protein-tyrosine kinases in human cancers. *Pharmacolog. Res.* 2019;139:395-411. doi: 10.1016/j.phrs.2018.11.014. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30500458>
7. Vecchione L., Jacobs B., Normanno N., Ciardiello F., Tejpar S. EGFR-targeted therapy. *Exp. Cell Res.* 2011;317:2765-2771. doi: 10.1016/j.yexcr.2011.08.021. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21925171>
8. Wang Z. ErbB Receptors and Cancer. *Methods Mol. Biol.* 2017;1652:3-35. doi: 10.1007/978-1-4939-7219-7\_1. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28791631>
9. Harris R.C., Chung E., Coffey R.J. EGF receptor ligands. *Exp. Cell Res.* 2003;284:2-13. doi: 10.1016/S0014-4827(02)00105-2. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12648462>
10. Liu S., Wang Y., Han Y., Xia W., Zhang L., Xu S., Ju H., Zhang X., Ren G., Liu L., et al. EREG-driven oncogenesis of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma exhibits higher sensitivity to Erlotinib therapy. *Theranostics.* 2020;10:10589-10605. doi: 10.7150/thno.47176. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32929368>
11. Schneider M.R., Wolf E. The epidermal growth factor receptor ligands at a glance. *J. Cell Physiol.* 2009;218:460-466. doi: 10.1002/jcp.21635. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19006176>
12. Hinkle C.L., Sunnarborg S.W., Loiselle D., Parker C.E., Stevenson M., Russell W.E., Lee D.C. Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting en-

- zyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: The juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J. Biol. Chem.* 2004;279:24179–24188. doi: 10.1074/jbc.M312141200. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15066986>
13. Cheng WL, Feng PH, Lee KY, Chen KY, Sun WL, Van Hiep N, Luo CS, Wu SM. The Role of EREG/EGFR Pathway in Tumor Progression. *Int J Mol Sci.* 2021 Nov 27;22(23):12828. doi: 10.3390/ijms222312828. PMID: 34884633; PMCID: PMC8657471. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34884633/>
  14. Laurence, D. J. & Gusterson, B. A. The epidermal growth factor. A review of structural and functional relationships in the normal organism and in cancer cells. *Tumour Biol.* 11, 229–261 (1990).
  15. Carpenter, G. & Cohen, S. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 265, 7709–7712 (1990).
  16. Holbro, T.; Civenni, G.; Hynes, N.E. The ErbB Receptors and Their Role in Cancer Progression. *Exp Cell Res.* 2003, 284, 99–110
  17. Sierra-Rodero B, Cruz-Bermúdez A, Nadal E, Garitaonandía Y, Insa A, Mosquera J, Casal-Rubio J, Dómine M, Majem M, Rodríguez-Abreu D, Martínez-Martí A, De Castro Carpeño J, Cobo M, López Vivanco G, Del Barco E, Bernabé Caro R, Viñolas N, Barneto Aranda I, Viteri S, Massuti B, Laza-Briviesca R, Casarrubios M, García-Grande A, Romero A, Franco F, Provencio M. Clinical and molecular parameters associated to pneumonitis development in non-small-cell lung cancer patients receiving chemoimmunotherapy from NADIM trial. *J Immunother Cancer.* 2021 Aug;9(8):e002804. doi: 10.1136/jitc-2021-002804. PMID: 34446577; PMCID: PMC8395363.
  18. Knut & Alice Wallenberg Foundation. Estocolo, Suecia. Human Protein Atlas Project: EGF. Disponible en: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000229894-GK3P/immune+cell>
  19. Chen L, Liu Y, Wu J, Deng C, Tan J, Liu H, Zhong L. Lung adenocarcinoma patients have higher risk of SARS-CoV-2 infection. *Aging (Albany NY).* 2021 Jan 10;13(2):1620-1632. doi: 10.18632/aging.202375. Epub 2021 Jan 10. PMID: 33429366; PMCID: PMC7880402.
  20. Jamal Jameel K, Gallert WJ, Yanik SD, Panek S, Kronsbein J, Jungck D, Koch A, Knobloch J. Biomarkers for Comorbidities Modulate the Activity of T-Cells in COPD. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 2;22(13):7187. doi: 10.3390/ijms22137187. PMID: 34281240; PMCID: PMC8269158.
  21. <https://support.minitab.com/es-mx/minitab/21/help-and-how-to/statistics/nonparametrics/supporting-topics/understanding-nonparametric-methods/>
  22. Meybosch S, De Monie A, Anné C, Bruyndonckx L, Jürgens A, De Winter BY, Trouet D, Ledeganck KJ. Epidermal growth factor and its influencing variables in healthy children and adults. *PLoS One.* 2019 Jan 24;14(1):e0211212. doi: 10.1371/journal.pone.0211212. PMID: 30677083; PMCID: PMC6345470.
  23. Idania, G., et al. "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* 8.2 (2017).
  24. Samarakoon R, Overstreet JM, Higgins PJ. TGF- $\beta$  signaling in tissue fibrosis: redox controls, target genes and therapeutic opportunities. *Cell Signal.* [revista en Internet] 2013 enero; [acceso 10 de enero de 2022];25(1):264-8

25. Kelly EJ, Newell SJ, Brownlee KG, et al. Role of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha in the developing stomach. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* [revista en Internet] 1997 mayo [acceso 10 de enero de 2022];76(3):F158-62.
26. Iamaroon A, Tait B, Diewert VM. Cell proliferation and expression of EGF, TGF- $\alpha$ , and EGF receptor in the developing primary palate. *J Dent Res.* [revista en Internet] 1996 agosto [acceso 10 de enero de 2022];75(8):1534-9.
27. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, et al (2004). "A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes". *Proc Natl Acad Sci USA.* 101 (16): 6062-7. Doi:10.1073/pnas.0400782101. PMID 15075390.
28. Luwor RB, Baradaran B, Taylor LE, et al. Targeting Stat3 and Smad7 to restore TGF- $\beta$  cytosolic regulation of tumor cells in vitro and in vivo. *Oncogene.* [revista en Internet] 2013 mayo [acceso 10 de enero de 2022];32(19):2433-41
29. Human Protein Atlas [base de datos en Internet]. Stockholm: Knut & Alice Wallenberg Foundation; c2003-2023, [fecha de acceso 19 de diciembre de 2005]. Disponible en: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000138798-EGF/blood+protein>
30. Mathilde IK, Aalund OD, Alnor A, Brandslund I, Bechmann T, Madsen JK. (2019) EGFR and EGFR ligands in serum in healthy women; reference intervals and age dependency. *Clin Chem Lab Med*; aop: <https://doi.org/10.1515/cclm-2019-0376>
31. Kalinina O, Golovkin A, Zaikova E, Aquino A, Bezrukikh V, Melnik O, Vasilieva E, Karonova T, Kudryavtsev I, Shlyakhto E. Cytokine Storm Signature in Patients with Moderate and Severe COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2022 Aug 10;23(16):8879. doi: 10.3390/ijms23168879. PMID: 36012146; PMCID: PMC9408700.
32. COvid-19 Multi-omics Blood ATlas (COMBAT) Consortium. Electronic address: julian.knight@well.ox.ac.uk; COvid-19 Multi-omics Blood ATlas (COMBAT) Consortium. A blood atlas of COVID-19 defines hallmarks of disease severity and specificity. *Cell.* 2022 Mar 3;185(5):916-938.e58. doi: 10.1016/j.cell.2022.01.012. Epub 2022 Jan 21. PMID: 35216673; PMCID: PMC8776501.
33. Madè A, Greco S, Vausort M, Miliotis M, Schordan E, Baksi S, Zhang L, Baryshnikova E, Ranucci M, Cardani R, Fagherazzi G, Ollert M, Tastsoglou S, Vatsellas G, Hatzigeorgiou A, Firat H, Devaux Y, Martelli F. Association of miR-144 levels in the peripheral blood with COVID-19 severity and mortality. *Sci Rep.* 2022 Nov 21;12(1):20048. doi: 10.1038/s41598-022-23922-2. PMID: 36414650; PMCID: PMC9681736.