

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Evaluación de la expresión del factor de crecimiento vascular endotelial en células A549 neuroendócrinas por medio de rt- PCR semicuantitativo”

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANA LAURA GUTIÉRREZ SILVA

DIRIGIDA POR

DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

Santiago De Querétaro, Querétaro, 2021



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“Evaluación de la expresión del factor de crecimiento vascular
endotelial en células A549 neuroendócrinas por medio de
rt-PCR semicuantitativo”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ANA LAURA GUTIÉRREZ SILVA

DIRIGIDA POR

DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODALES

DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
DIRECTOR

DRA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER
SINODAL

DRA. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA
SINODAL

ING. CARLOS MANUEL URIBE VILLARREAL
SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Cáncer de pulmón	1
1.2 Tumores neuroendócrinos.	3
1.2.1 Diferenciación neuroendócrina.	6
1.2.2 Inducción de la transdiferenciación neuroendócrina en cultivo celular.	7
1.3 VEGF	8
1.3.1 Vía de señalización del VEGF.	9
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 General	11
3.2 Específicos	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1 Materiales	12
4.2 Métodos	12
4.3 Diseño experimental	14
5. RESULTADOS	15
6. DISCUSIÓN	19

7. CONCLUSIONES	22
8. BIBLIOGRAFÍA	23

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Genes blanco para rt-PCR semicuantitativo.	14

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1 Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad en todo el mundo, 2018.	1
2 Relación entre el tipo celular del epitelio de las vías respiratorias y el origen del tipo de cáncer de pulmón.	3
3 Clasificación de tumores neuroendócrinos.	4
4 Vía de señalización de AMPc.	7
5 Comparación de la proliferación celular entre las células A549 y las A549NED.	15
6 Cambios morfológicos en las células A549 después del tratamiento con IBMX a las 24, 48 y 72 h.	16
7 Productos de la rt-PCR para los marcadores neuroendocrinos.	16
8 Expresión de ARNm para marcadores neuroendócrinos.	17
9 Análisis de la rt-PCR para VEGF.	18

RESUMEN

Según GLOBOCAN, el cáncer de pulmón es el tercer cáncer con mayor incidencia en el mundo, además es responsable del 18 % de muertes en ambos sexos. Se divide en dos grandes grupos histológicos: carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). La clasificación que comprende a los tumores neuroendócrinos engloba a aquellas neoplasias que exhiben un comportamiento, morfología y biología distintivos que han tomado gran importancia porque representan cerca del 2% de los casos de cáncer de pulmón y pertenecen al 30% de todas las neoplasias neuroendócrinas. Por otro lado, la angiogénesis representa un evento clave en su desarrollo y progresión debido a que los tumores neuroendócrinos están altamente vascularizados y presentan una mayor expresión del principal mediador, el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). La expresión de este factor está ampliamente documentada en tumores neuroendócrinos como los pancreáticos, gastrointestinales y de ovario, no obstante, la información de su expresión en células A549 transdiferenciadas a neuroendócrinas no existe, por lo que el objetivo de este trabajo es investigar los niveles de expresión de VEGF en células A459 neuroendócrinas (A549NED) por medio de rt-PCR semicuantitativo. En el presente trabajo, se encontró la expresión de VEGF en las células A549 y la evaluación realizada no mostró una diferencia significativa con la expresión del ARN mensajero de este marcador para las células A549NED, estos hallazgos sugieren que existen otros mecanismos involucrados en la expresión de este marcador.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Laura Cristina Berumen Segura, mi más sincero agradecimiento por brindarme su guía, apoyo, paciencia y motivación en la construcción de este trabajo. También recibe un especial agradecimiento, la Ing. en biotecnología Jazmín Esmeralda Soto, quien con su conocimiento me instruyó y asesoró durante el desarrollo experimental de este trabajo, pero sobre todo se convirtió en una querida amiga.

Por otro lado, agradezco a la Dra. Guadalupe García Alcocer, a la Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera y al Ing. Carlos Manuel Uribe Villarreal por aceptar la invitación a participar como sinodales de mi trabajo de tesis. Además, recibe reconocimiento la Dra. Irasema Mendieta Trejo por su apoyo en el cultivo de la línea celular A549 de adenocarcinoma de pulmón.

Asimismo, quiero expresar mi gratitud por el financiamiento otorgado a CONACYT a través del proyecto A1-S-25275 y el proyecto 316849 del Fondo de Desarrollo Científico 2 (FOP02-2021-04), así como a la Universidad Autónoma de Querétaro por el apoyo recibido por medio del proyecto FOFI (FCQ201820).

Finalmente, pero no menos importante a mis padres, a mi hermana María Paula, a Marco A. Martínez Marú y a mis seres queridos, quienes me acompañan y me brindan la motivación para seguir superándome.

1. ANTECEDENTES

1.1 Cáncer de pulmón.

Alrededor del mundo el cáncer de pulmón es líder en mortalidad sin hacer distinción entre hombres y mujeres ocasionando 1.8 millones de muertes y ocupa el tercer lugar como el cáncer más frecuente con 2.1 millones de casos nuevos anuales, con base en la información del GLOBOCAN 2018 (Figura 1) (Leiro-Fernández y col., 2019).

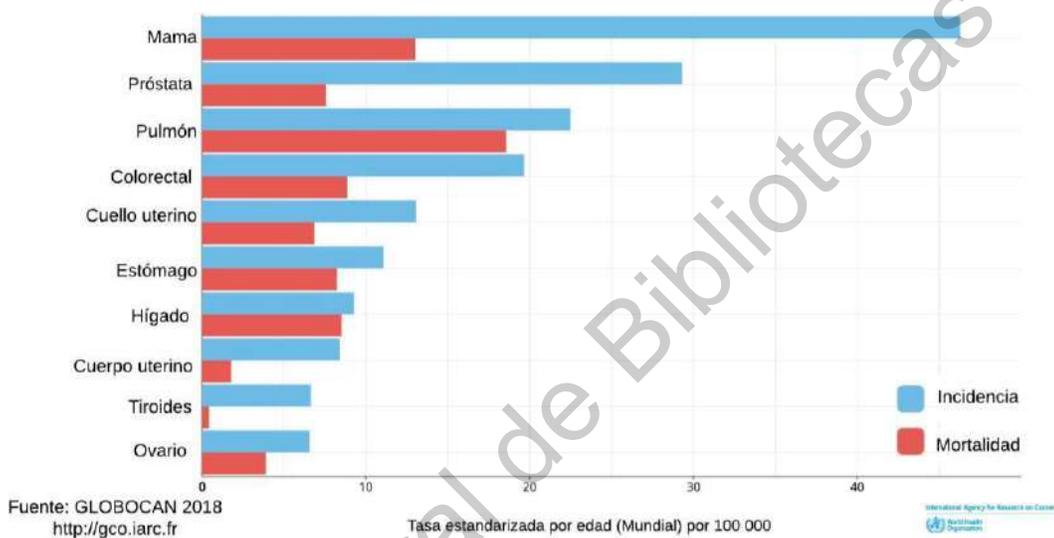


Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad estandarizadas por edad en todo el mundo en 2018. Se observa que el cáncer de pulmón posee una mayor mortalidad y que es el tercero con mayor incidencia (GLOBOCAN, 2018).

El cáncer de pulmón es clasificado en dos grandes grupos de acuerdo al tipo histopatológico: carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, por sus siglas en inglés). El primero representa cerca del 15 % de los casos totales de cáncer de pulmón mientras que el último es predominante con el 85 % de los casos. Adicionalmente, el NSCLC se divide en tres subtipos: carcinoma de células escamosas, carcinoma neuroendócrino de células grandes y adenocarcinoma, que es el más común (Gallant y Lovly, 2018; Chen y col., 2019).

Este cáncer al igual que los demás, es el resultado de cambios moleculares anormales, genéticos y epigenéticos en las células pulmonares de los pacientes

(Khanmohammadi y col., 2020). Es una enfermedad heterogénea, en la que influye tanto el tipo celular de origen como las alteraciones moleculares (Herbst y col., 2018), debido a que el epitelio de las vías respiratorias incluye diferentes tipos celulares que poseen características fisiológicas propias. Por ejemplo, el adenocarcinoma se origina de las células alveolares tipo II o de células madre bronquioalveolares. Las células alveolares tipo II secretan surfactante, reduciendo la tensión superficial en el alvéolo y previniendo el colapso del espacio aéreo, además de que son parte importante de la respuesta inmune innata en los pulmones (Jacob y col., 2019). En cambio, el SCLC procede de células neuroendocrinas (Figura 2). Por lo tanto, cada subtipo posee un perfil de expresión génica y biomarcadores específicos (Devarakonda y col., 2019; Chen y col., 2019). Otro evento importante en el desarrollo de la enfermedad es la metilación aberrante del ADN que ocasiona el silenciamiento de la expresión de genes supresores de tumores como son; p53, PTEN o BCRA 1 y 2, siendo un sello distintivo del cáncer (Druisseaux y Esteller, 2018; Chen y col., 2020). Con las nuevas técnicas genómicas y de secuenciación se han podido identificar las alteraciones en la transcripción de genes importantes en adenocarcinoma KRAS y EGFR, además de AKT3, FGFR1, PTEN encontrados en cáncer de pulmón y finalmente la identificación de alteraciones en los siguientes genes supresores de tumores TP53, KEAP1, STK11 y NF1 (Drula y col., 2020; Herbst y col., 2018).

El principal factor de riesgo para el cáncer de pulmón es el tabaco, ya que se ha asociado hasta en un 80%, pero también se ven involucrados otros factores en su desarrollo como lo son la contaminación del aire, el tabaquismo pasivo, la exposición al radón, asbestos y algunos metales como el cadmio u otras sustancias orgánicas (Testa y col., 2018; Herbst y col., 2018).

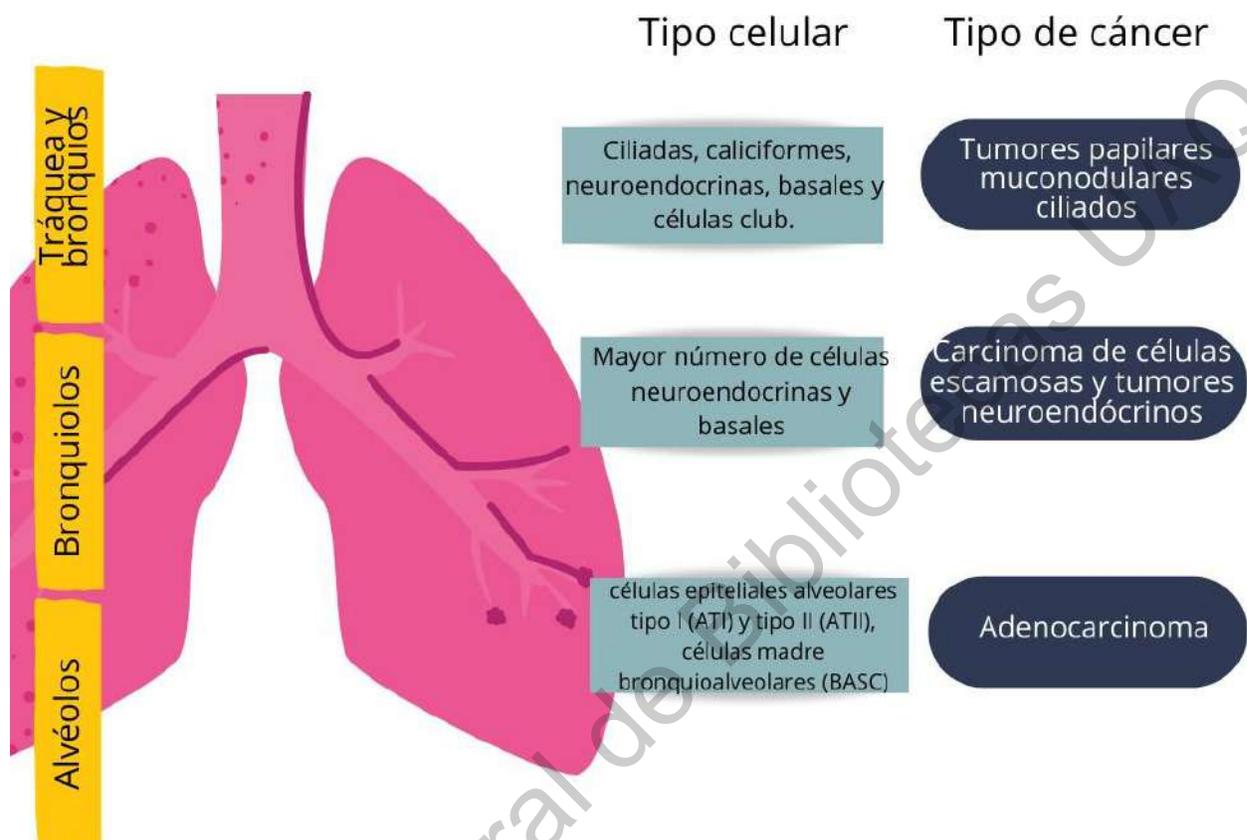


Figura 2. Relación entre el tipo celular del epitelio de las vías respiratorias y el origen del tipo de cáncer de pulmón. En las vías proximales del tracto respiratorio, es decir, tráquea y bronquios, abundan las células ciliadas, las células basales, las células caliciformes, células neuroendócrinas y células club, cada una con una función fisiológica específica; siguiendo con los bronquiolos, las células que más abundan son las células neuroendócrinas y las células club; mientras que en las vías distales (alvéolos), las células que predominan son las células epiteliales alveolares tipo I y tipo II y las células madre bronquioalveolares (Sarode y col., 2020).

1.2 Tumores neuroendócrinos.

Los tumores neuroendócrinos de pulmón se consideran un grupo heterogéneo de neoplasias que presentan una biología, morfología y un comportamiento clínico diferente al de los otros tumores de pulmón (Uccella y col., 2018a); han ganado un creciente interés debido al aumento en su incidencia en los últimos años, ya que solamente los tumores carcinoides bien diferenciados, representan cerca del 2% de los casos de cáncer de pulmón y aproximadamente 27% de todos los tumores

neuroendocrinos (Hendifar y col., 2017). De acuerdo con la clasificación propuesta en 2015 por la Organización Mundial de la Salud, existen cuatro tipos: carcinoide típico (TC, por sus siglas en inglés), carcinoide atípico (AC, por sus siglas en inglés), carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC, por sus siglas en inglés) y carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés), estos últimos se han asociado con antecedentes de tabaquismo (Figura 3) (Wolin, 2017). A su vez también se pueden agrupar por el grado de diferenciación celular y grado de agresividad de la enfermedad, por ejemplo, TC y AC se agrupan como carcinoides bien diferenciados de bajo y mediano grado respectivamente, mientras que LCNEC y SCLC se consideran carcinomas pobremente diferenciados y de alto grado (Hendifar y col., 2017).

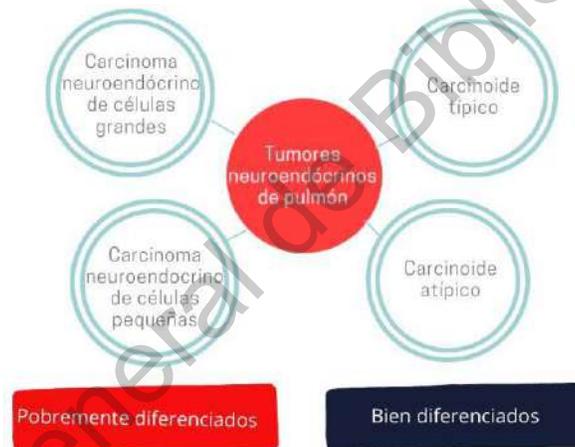


Figura 3. Clasificación de tumores neuroendócrinos. La Organización Mundial de la Salud categoriza en cuatro subtipos a los tumores neuroendócrinos: carcinoide típico (TC, por sus siglas en inglés), carcinoide atípico (AC, por sus siglas en inglés), carcinoma neuroendocrino de células grandes (LCNEC, por sus siglas en inglés) y carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés), los dos primeros cuentan con una diferenciación celular bien definida mientras que los últimos exhiben una diferenciación celular muy pobre.

Por otro lado, se ha evaluado a los tumores neuroendócrinos desde diferentes enfoques para comprender su comportamiento biológico y desarrollar terapias o tener un diagnóstico más certero, debido a que del 30 % al 50 % son inicialmente asintomáticos y al momento de realizar el diagnóstico se presentan en etapas muy avanzadas (Wolin, 2017). Por esa razón el uso de marcadores histopatológicos,

genéticos y moleculares es crucial para establecer un diagnóstico diferencial y elegir el tratamiento más adecuado (Kyriakopoulos y col., 2018). Para la diferenciación histopatológica, se evalúan criterios como el tamaño celular y la tasa de proliferación, que puede ser más lenta o acelerada según el subtipo de tumor neuroendócrino, además se puede utilizar la proteína Ki-67 como marcador de proliferación celular (Chan y col., 2017), además comparten una morfología poligonal con un patrón de distribución específico (Mendieta y col., 2018). Con la innovación en las técnicas genéticas y moleculares se han podido identificar marcadores para los AC y TC, por ejemplo, se han documentado alteraciones en los genes: EGFR, ERBB2, KRAS y PIK3CA (gen fosfatidilinositol-3 cinasa), no obstante, esto es poco común, aunque se ha encontrado que la mutación en MEN1 es frecuente entre los carcinoides (Kashima y col., 2019; Rossi y col., 2017). Por otro lado, se ha identificado un perfil diferencial de 24 microARNs entre AC y TC, además de 29 microARNs en tumores metastásicos y no metastásicos. Este avance ha abierto la posibilidad de usarlos como marcadores y herramientas para el diagnóstico específico de tumores neuroendócrinos bien diferenciados (Kashima y col., 2019). Ahora bien, LCNEC y SCLC comprenden un perfil de alteraciones moleculares más definido, aunque comparten alteraciones en RB1 y TP53 (Rossi y col., 2017), se ha documentado que SCLC exhibe las siguientes alteraciones genéticas: MYC, FHIT, RASSF1A y BAX/BCL2, mientras que LCNEC presenta alteraciones en STK11, KEAP1 y KRAS (Sarode y col., 2020). En cuanto a los marcadores inmunohistoquímicos, éstos se utilizan como una herramienta rápida, de bajo costo y menos compleja comparada con otras técnicas.

Tradicionalmente se consideran los siguientes como marcadores neuroendócrinos: cromogranina A (CgA), sinaptofisina y enolasa específica de neuronas (NSE) (Uccella y col., 2018b), aunque se pueden emplear diferentes marcadores, los más utilizados y mejor aceptados son los dos primeros.

En primer lugar, la cromogranina A es una glicoproteína ácida de la familia de las graninas (Kyriakopoulos y col., 2018), secretada por las células neuroendócrinas y expresada por los tumores neuroendócrinos (Malczewska y col., 2019). Cabe mencionar que en tumores pobremente diferenciados los niveles de cromogranina

disminuyen, lo cual es indicativo de un mal pronóstico (Chan y col., 2017). En lo que se refiere a la sinaptofisina es una glicoproteína de membrana, se ubica en microvesículas en el citoplasma de las células neuroendócrinas tanto normales como neoplásicas, incluso es un mejor marcador para diferenciar tumores neuroendócrinos debido a que se expresa en todos los tumores neuroendócrinos de pulmón (Uccella y col., 2018b). La enolasa específica de neuronas (NSE) es otro marcador que se utiliza ampliamente como diferenciador neuroendócrino, se trata de una enzima expresada por células de origen neuronal; cuya expresión se relaciona con un tumor neuroendócrino de células pobremente diferenciadas, además, niveles elevados pueden ser indicativo de SCLC y claramente un pronóstico muy desalentador de la enfermedad (Chan y col., 2017)

1.2.1 Diferenciación neuroendocrina.

Recientemente se ha observado la transición de carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), específicamente de adenocarcinoma a carcinoma de pulmón de células pequeñas (SCLC) o a carcinoma de células escamosas (SCC, por sus siglas en inglés), lo cual se ha asociado con la resistencia a las terapias (Chen y col., 2019). Cabe mencionar que se han desarrollado varios estudios con avances reveladores para entender los mecanismos genéticos que propician la transformación histológica, un ejemplo es la identificación de alteraciones en el gen EGFR, específicamente la delección en el exón 19 o la mutación T790M, la cual es una mutación puntual de un aminoácido en la posición 790 (Marcoux y col., 2019; Chen y col., 2019). Estas mutaciones son promovidas durante el tratamiento con inhibidor de la tirosina quinasa de EGFR, además, entre el 3 % y 10 % de las biopsias que presentan una transformación histológica a SCLC se relacionan con la resistencia a este tratamiento (Marcoux y col., 2019). Asimismo, se ha encontrado que la inactivación de TP53 y Rb1, la amplificación de MET y mutaciones en PIK3CA o BRAF indican una mayor probabilidad de que ocurra la transición histológica (Marcoux y col., 2019; Zhao y col., 2017). Por consiguiente, es necesario encontrar una nueva estrategia terapéutica que no presente un mecanismo de resistencia para aumentar la supervivencia de los pacientes con NSCLC.

1.2.2 Inducción de la transdiferenciación neuroendócrina en cultivo celular.

En el laboratorio se puede inducir la transdiferenciación neuroendócrina *in vitro*, utilizando agentes que elevan los niveles intracelulares de AMPc (adenosina monofosfato-3,5' cíclico) (Mendieta y col., 2018), se ha propuesto que la vía de señalización de este segundo mensajero juega un papel muy importante en la regulación del metabolismo, la proliferación celular, diferenciación y apoptosis (Lv y col., 2018). Uno de los agentes más utilizados es el 3-isobutil-1-metilxantina, un inhibidor de la fosfodiesterasa de amplio espectro, enzima que participa como reguladora de los niveles de AMPc (Lv y col., 2018). De manera general cuando se inhibe la fosfodiesterasa (PDE, por sus siglas en inglés) se elevan los niveles de AMPc y activa a la PKA (proteína quinasa A) lo que resulta en la activación de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta AMPc) que a su vez promueve la transcripción de varios genes implicados en la diferenciación neuroendócrina (Figura 4), (Wang y col., 2020). Sin embargo, se ha reportado que la forskolina, la interleucina 6, la radiación ionizante y el factor de crecimiento epidérmico también promueven el cambio a fenotipo neuroendócrino en cáncer de pulmón y de próstata (Mendieta y col., 2018).

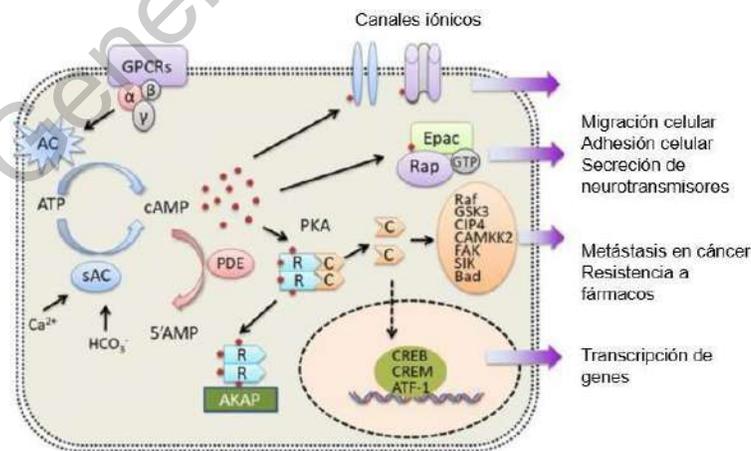


Figura 4. Vía de señalización de AMPc. Esta vía de señalización está comúnmente relacionada con los receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), que al activarse promueve la conversión de la adenosina 5'-trifosfato (ATP) a AMPc (adenosina monofosfato-3,5' cíclico) catalizado por la enzima adenilato ciclasa (AC), provocando que se eleven los niveles intracelulares de AMPc y activando a la PKA (proteína quinasa A) lo que resulta en la fosforilación y activación del factor de transcripción CREB (proteína de unión al elemento de respuesta AMPc) (Zhang y col., 2020).

1.3 VEGF.

Otro evento clave en el desarrollo del cáncer, es la angiogénesis (Berardi y col., 2018). Se define como la formación de nuevos vasos sanguíneos y se considera de gran importancia debido a que se ha demostrado que aporta una mayor oxigenación y nutrientes necesarios para la incidencia, progresión y metástasis del cáncer de pulmón (Rodríguez-Remírez y col., 2019; Guo y col., 2018). El desarrollo de la nueva vasculatura depende de un proceso dinámico que involucra la interacción de células endoteliales y el espacio extracelular, donde es clave el balance de muchos factores angiogénicos como angiopoyetinas, CCL2, EGFL6, incluyendo FGF, HIF1, IGF1, MMPs, PDGF, TGF y VEGF (Wang y col., 2020). El principal mediador es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF, por sus siglas en inglés), una glicoproteína homodimérica con un peso molecular de 40kDa, perteneciente a una familia de factores de crecimiento que incluye varias isoformas: A, B, C, D y el factor de crecimiento placentario (Chen y col., 2018a).

Además, al unirse a sus receptores identificados como VEGFR1, 2 y 3 así como a las neuropilinas (NP1 y 2), desencadena su función biológica que incluye diferenciación celular, migración, regulación de la permeabilidad vascular y por supuesto la angiogénesis (Chen y col., 2018a; Guo y col., 2018).

Cabe destacar que está bien documentada la expresión elevada de VEGF en varios tipos de cáncer como, por ejemplo: pancreático, estomacal, colorrectal, de mama y de próstata (Chen y col., 2018a). En cuanto a los tumores neuroendócrinos, estos están altamente vascularizados y se ha encontrado una relación positiva con una expresión de marcadores neuroendócrinos más marcada (Kyriakopoulos y col., 2018; Wang y col., 2020). Asimismo, la expresión del VEGF se ha observado en tumores agresivos y se asocia con un pronóstico desalentador, por esa razón, la vía de señalización del VEGF se ha estudiado ampliamente para encontrar y desarrollar tratamientos dirigidos para neoplasias neuroendocrinas de pulmón, sin embargo, no se ha llegado a un entendimiento total sobre la relación del pronóstico con la sobreexpresión de VEGF (Berardi y col., 2018; Shi y col., 2019).

1.3.1 Vía de señalización del VEGF.

Desde que en 1970 se propuso la terapia antiangiogénica se han hecho muchos avances con el propósito de elucidar la vía de señalización del VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial, por sus siglas en inglés), intentado identificar nuevos objetivos para el tratamiento de diferentes neoplasias neuroendócrinas así como el papel que juega la expresión del VEGF y sus receptores en el pronóstico de la enfermedad (Wu y col., 2018; Itatani y col., 2018; Berardi y col., 2018).

De manera general el VEGF interactúa con sus receptores VEGFR-1, 2 y 3 estos son receptores tirosina quinasa, y también puede interactuar con las neuropilinas 1 y 2 que funcionan como co-receptores no enzimáticos (Rodríguez-Remírez y col., 2019). Una vez que se activa el receptor se inicia la transducción de señales intracelulares en las que participan varios mediadores, por ejemplo, para el VEGFR-2 la autofosforilación de sus dominios inicia uno de los posibles escenarios para la cascada de señalización. En el primer escenario, el aumento de los niveles de calcio intracelular (Ca^{2+}) se debe a la activación de PI3K (fosfatidilinositol-3 quinasa, por sus siglas en inglés) y de Akt que a su vez promueven la actividad de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS, por sus siglas en inglés) que mediante su unión a la calmodulina (CaM) da como resultado el aumento de la producción NO (óxido nítrico) (Pandey y col., 2018). El segundo escenario de la vía de señalización empieza con la activación de la fosfolipasa C (PLC γ , por sus siglas en inglés), la cual cataliza la reacción de conversión de PIP2 (fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato) a diacilglicerol (DAG) e IP3 (inositol 1,4,5- trifosfato). Además, DAG tiene la capacidad de activar a PKC (proteína quinasa C) y a través de MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) activa a la fosfolipasa A2 cuyo resultado final es el aumento de los niveles de prostaciclina (PGI₂). Ambos productos, PGI₂ y NO, son mediadores biológicos de la permeabilidad vascular, vasorelajación y supervivencia endotelial (Pandey y col., 2018). Finalmente, la expresión de VEGF se ve afectada por múltiples factores entre los que destacan la hipoxia, el gradiente de NO, microRNAs, transductores como STAT3 (Wu y col., 2018).

2. HIPÓTESIS

Las células A549 con fenotipo neuroendócrino presentan mayor expresión de VEGF que las células A549.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Identificar la expresión del VEGF en las células A549 con fenotipo neuroendócrino.

3.2 Específicos

- Generar el fenotipo neuroendócrino de las células A549 bajo la presencia de isobutil-1-metilxantina.
- Identificar el fenotipo neuroendócrino de las células A459 mediante marcadores específicos.
- Evaluar la expresión del VEGF en células A549 con fenotipo neuroendócrino mediante rt-PCR semicuantitativo.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Reactivos

En el presente trabajo se utilizaron células A549, una línea celular procedente de las células alveolares tipo II, ampliamente empleada como modelo de adenocarcinoma pulmonar, caracterizada por poseer células adherentes. Para mantenerlas en cultivo se utilizó el medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, por sus siglas en inglés) este medio es rico en glucosa, vitaminas y aminoácidos siendo el más adecuado para cultivo de células adherentes, asimismo se realizaron lavados con buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés). Por otro lado, se utilizó IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) para diferenciar las células A549 al fenotipo neuroendócrino. También se empleó Tripsina/EDTA de Gibco™, para eliminar las células de la superficie y Direct-zol RNA kit de Zymo Research para la extracción y purificación de ARN. Para la síntesis de ADN complementario (ADNc) a partir del ARN previamente extraído, se utilizó el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis de Thermo Scientific. Finalmente se utilizó GoTaq® Green Master Mix de Promega, para la amplificación eficiente de ADNc mediante PCR.

4.1.2 Cultivo celular

Las células A549 se mantuvieron en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado al 10% con suero fetal bovino, 100 kU/mL de penicilina y 100 kU/mL de estreptomina. Los cultivos se mantuvieron en una atmósfera con 5% de dióxido de carbono a 37°C, de acuerdo a Mendieta y col. (2018).

4.2 Métodos

4.2.1 Diferenciación neuroendócrina

Se cultivaron las células A549 en una caja Petri de 60 mm con 5 mL de DMEM a una confluencia del 60% durante 24 h. Se lavaron con 500 µL de PBS y posteriormente se inició el tratamiento con 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 0.5 mM) durante 72 h,

de acuerdo a Mendieta y col. (2018), además se utilizó un control negativo. Se recolectaron las células mediante tripsinización para el análisis de la expresión del VEGF. Adicionalmente, se evaluaron los cambios morfológicos mediante microscopía óptica a las 24, 48 y 72 horas después de iniciado el tratamiento.

4.2.2 Ensayo de proliferación

Para comparar la proliferación entre las células A549 y las células diferenciadas, se realizó su cultivo en una placa de 24 pozos, donde se sembraron aproximadamente 25,000 células con 250 μ L de DMEM, de los cuales se tomaron muestras por triplicado a las 0, 24, 48 y 72 h para su conteo. Estas se tiñeron con una solución azul de tripano al 0.04 % y se procedió al recuento de las células utilizando un hemocitómetro para determinar la densidad celular.

4.2.3 Extracción de ARN y rt-PCR semicuantitativo

Se llevó a cabo la extracción de ARN total de las células A549 control y las tratadas con IBMX utilizando el kit Direct-zol ARN Miniprep Plus, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. A continuación, se cuantificó el ARN obtenido en un espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Scientific), para evaluar su pureza y la concentración. Posteriormente, se sintetizó ADN complementario (ADNc) con el Kit de síntesis de ADNc RevertAid de Thermo Scientific siguiendo las instrucciones del fabricante.

Para realizar el rt-PCR semicuantitativo se empleó el GoTaq Green Master Mix para preparar las muestras previamente obtenidas, los genes de interés que se utilizaron se muestran en el Cuadro 1. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador miniPCR bajo las siguientes condiciones, 95 °C durante 30 s y 55°C durante 60s para la alineación, además una fase de extensión durante 60s a 72°C, con un periodo de extensión final de 72°C por 5 min. Además, todos los productos obtenidos fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 3 %, posteriormente se tiñeron con bromuro de etidio para visualizarlos.

Cuadro 1. Genes blanco para rt-PCR semicuantitativo.

Genes blanco	Forward	Reverso	
GADPH	5'CAGCCTCAAGATC ATCAGCA3'	5'TGTGGTCATGAGT CCTTCCA3'	Control
VEGF	5'CTACCTCCACCAT GCCAAGT3'	5'TCTCTCCTATGTG CTGGCCT3'	Gen de interés
SYP	5'TGCCAACAAGACC GAGAGTGA3'	5'CCACATGAAGGCG AACACAGC3'	Marcador neuroendócrino
NSE	5'GGCTACACGGAAA AGATCGTTATT3'	5'GAAGGATCAGTGG GAGACTTGAA3'	Marcador neuroendócrino

Abreviaciones: Sinaptofisina (SYP), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y enolasa específica de neuronas (NSE).

4.3 Diseño experimental

Se compararon dos grupos de la línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549, denominados grupo control (A549) y grupo experimental (A549NED). El grupo experimental se trató con IBMX (3-isobutil-1-metilxantina) 0.5 mM para realizar la transdiferenciación al fenotipo neuroendócrino.

Ambos cultivos se mantuvieron durante 72 horas de tratamiento bajo las condiciones descritas previamente, para la extracción de ARN y el análisis de la expresión ARN mensajero se utilizó una n= 3 para cada gen analizado. Adicionalmente para identificar la proliferación de ambos grupos se realizó una curva con una n=3 para cada uno, que de igual manera se tuvo en cultivo durante 72 h de tratamiento.

4.3.1 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism 5, mostrándose la media \pm error estándar para representar los datos de los experimentos realizados. La diferencia estadística se evaluó mediante la prueba t-student con $p < 0.05$ para diferencias significativas. La cuantificación relativa de ARNm se llevó a cabo con ayuda del software Image Lab de Bio-Rad.

5 RESULTADOS

El ensayo de proliferación con la tinción de Azul de tripano al 0.04 %, mostró que la diferenciación al fenotipo neuroendócrino de las células A549, inducido por 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, 0.5 mM), a las 72 horas de tratamiento, tomando en cuenta que el tiempo 0 corresponde a las 24 horas de cultivo, disminuye la proliferación celular respecto al control ($p < 0.05$) lo cual se puede correlacionar con la inhibición de la vía del AMPc (adenosina monofosfato-3,5' cíclico) (Figura 5). A su vez a partir de las 72 horas se observan cambios morfológicos (Figura 6), como alargamiento de la célula y la formación de proyecciones similares a las neuritas en comparación con las células A549 control que exhiben una forma poligonal.

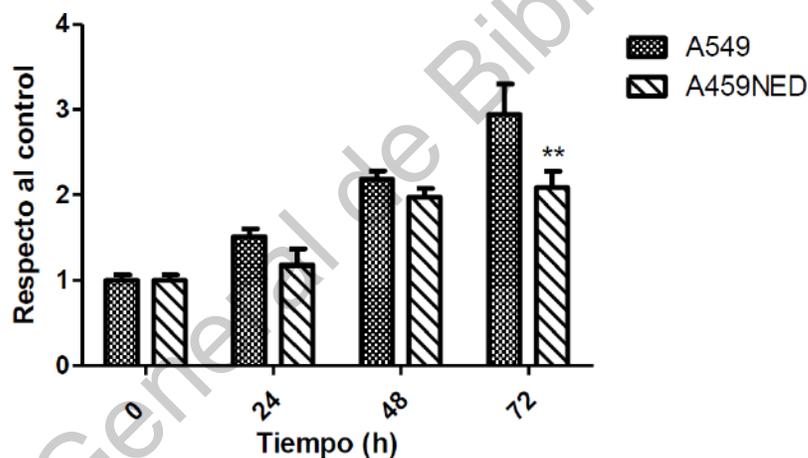


Figura 5. Comparación de la proliferación celular entre las células A549 y las A549NED. El tiempo 0 corresponde a las 24 horas después de sembrar las células en la placa de 24 pozos, para este ensayo se realizó un triplicado por línea celular de las mediciones. ** $p < 0.05$. t de student. Se representa a base 1 del control.

Por otro lado, para corroborar la diferenciación neuroendócrina se realizó rt-PCR con los siguientes marcadores neuroendócrinos: sinaptofisina (SYP) y enolasa específica de neuronas (NSE). Adicionalmente para comprobar que el ADNc (ADN complementario) de ambos fenotipos de las células A549 se preparó correctamente se tomó como referencia GAPDH (Figura 7).

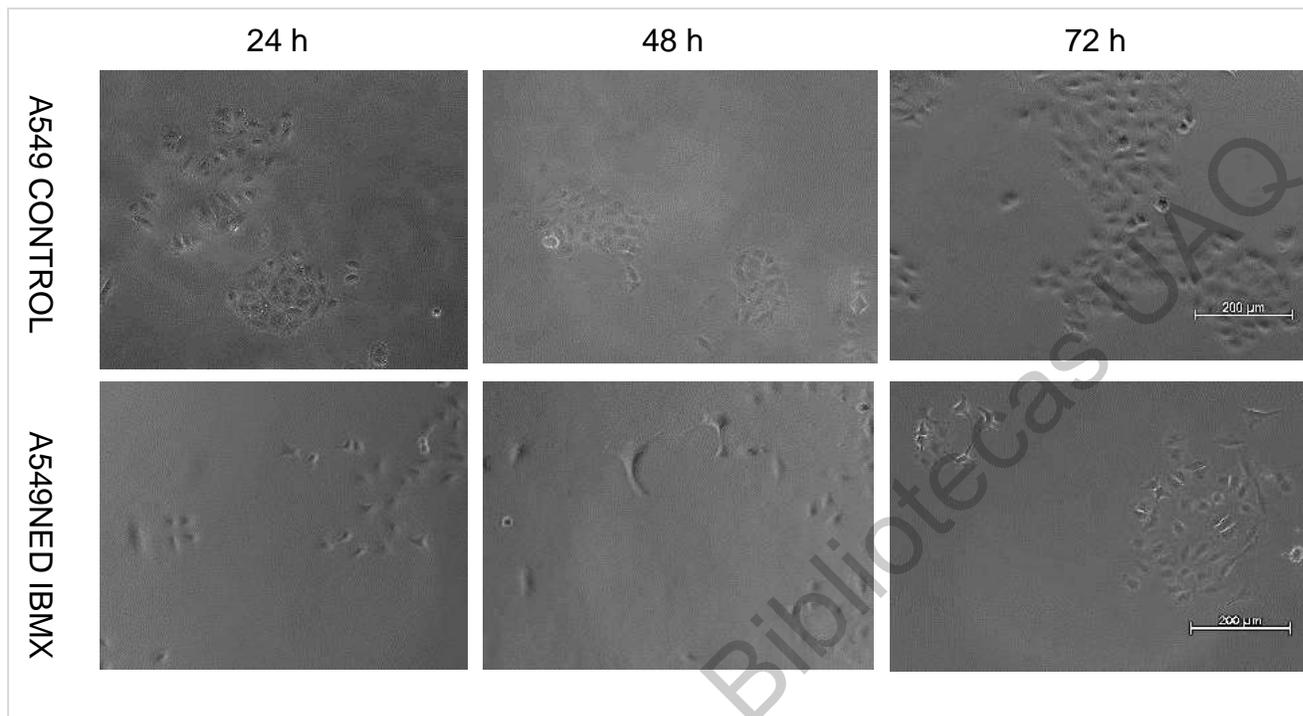


Figura 6. Cambios morfológicos en las células A549 después del tratamiento con IBMX a las 24, 48 y 72 h de tratamiento.

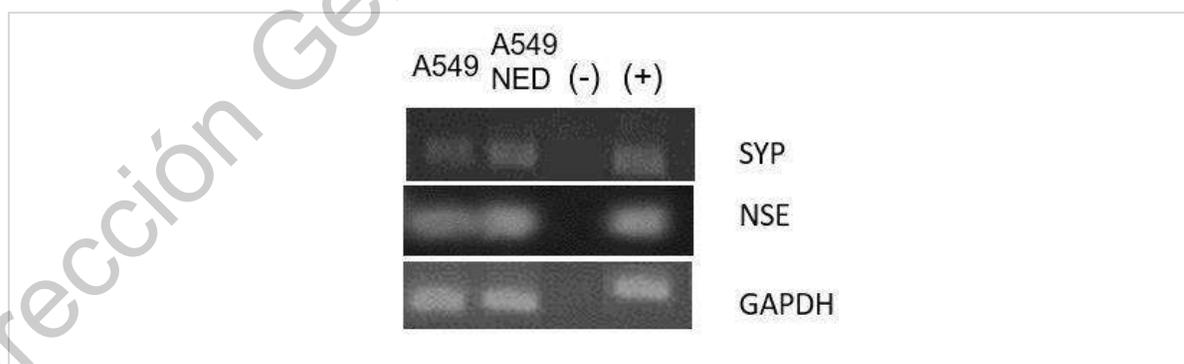


Figura 7. Productos de la rt-PCR para los marcadores neuroendócrinos. Los productos esperados se visualizaron en un gel de agarosa al 3 % y se obtuvieron las siguientes bandas para GAPDH 179 pb, para NSE (enolasa específica de neuronas) 101 pb, SYP (sinaptofisina) 349 pb.

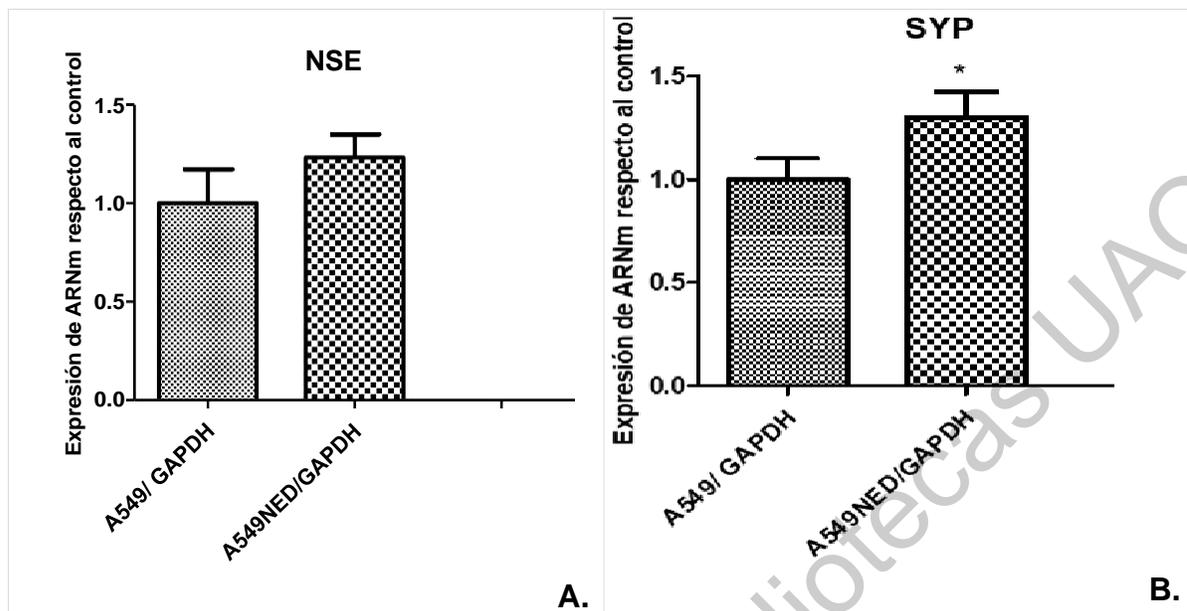


Figura 8. Expresión de ARNm para marcadores neuroendócrinos. A. Se ilustra la expresión de NSE para los dos fenotipos de las células A549. B. Asimismo se aprecia la expresión de SYP para ambos grupos. La cuantificación relativa se indica con base 1 al control, con una $n=3$ para ambos genes. Finalmente, la diferencia estadística entre líneas celulares se evaluó con la prueba t de student $*p<0.05$. Abreviación: ARNm (ARN mensajero).

En cuanto a la expresión de ARN mensajero (ARNm), se exhibe en la Figura 8 los resultados cuantitativos donde se indica que no existe diferencia significativa ($p<0.05$) entre ambos grupos, sin embargo, se observa un incremento del 23.2 % para NSE en el fenotipo neuroendócrino en comparación con las células no tratadas con IBMX (Figura 8A). Respecto a SYP hubo un aumento significativo ($p<0.05$) en las células A549NED (Figura 8B). Al evaluar la expresión de ARNm de VEGF no se observó una diferencia significativa ($p<0.05$) entre ambos fenotipos como se ilustra en la Figura 9.

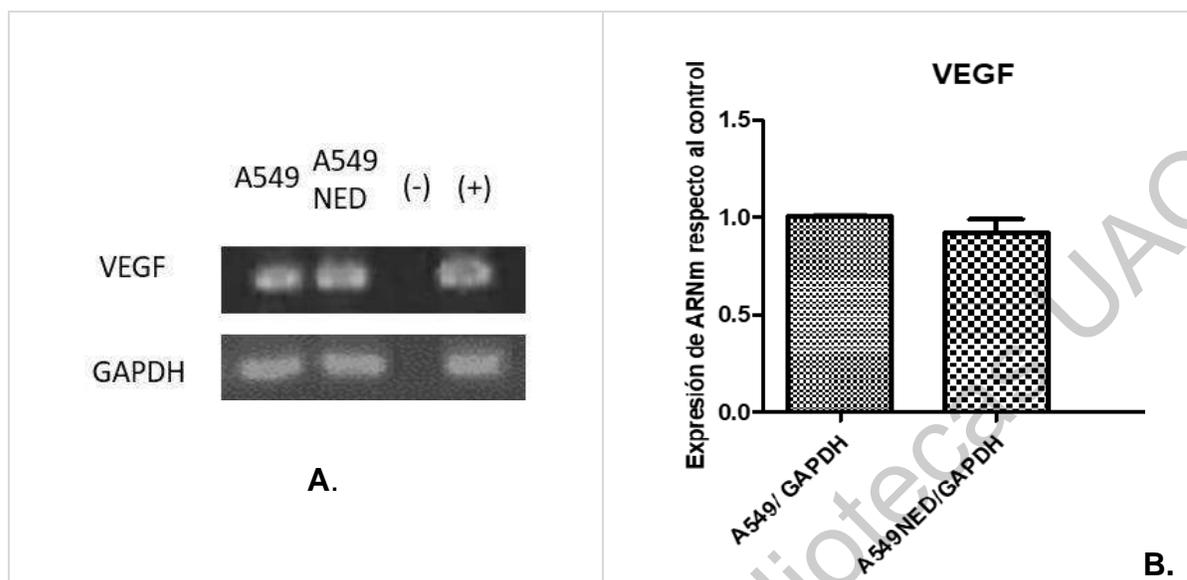


Figura 9. Análisis de la rt-PCR para VEGF. A. Los productos esperados de la rt-PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 3%, las bandas que se obtuvieron para VEGF y GAPDH fueron las siguientes: 311 pb y 179 pb, respectivamente. B Representa la cuantificación de VEGF con base 1 al control, donde se aprecia que no existe diferencia significativa, se evaluó con la prueba t de student con una $p < 0.05$.

6. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de ARNm para el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) de las células A549NED de adenocarcinoma pulmonar mediante rt-PCR. Proporcionamos evidencia de, que la expresión de ARNm para VEGF entre el cultivo de células A549 control y el fenotipo neuroendócrino de células A549 (A549NED) se mantiene sin diferencias.

Trabajos previos en nuestro grupo de investigación han estandarizado la metodología para inducir la transdiferenciación neuroendócrina en las células A549 mediante el incremento en la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), como por ejemplo con isobutilmetilxantina (IBMX; Mendieta y col., 2018). Los resultados de la transdiferenciación que se presentan en esta tesis concuerdan con lo conseguido anteriormente, ya que se observaron cambios morfológicos a las 72 horas de tratamiento, con patrones diferenciales al utilizar inhibidores de la fosfodiesterasa (PDE) o estimuladores directos de la adenilato ciclasa (AC), involucrados en las vía de señalización AMPc-PKA que a su vez resulta en la activación de CREB (proteína de unión al elemento de respuesta AMPc) que se relaciona con la preservación de las características neuroendócrinas en cáncer de pulmón (Zhang y col., 2020); las características incluyen la formación de neuritas y prolongaciones en las células.

Por su parte, la angiogénesis juega un papel importante en mediar la progresión en cáncer de células pequeñas (Peravali y col., 2020) y es uno de los factores con más relevancia involucrados en este proceso (Amano y col., 2021). Sin embargo, no se conocía si las células con fenotipo neuroendócrino de adenocarcinoma de pulmón participaban en este proceso con la liberación diferencial de VEGF; corroboramos la expresión de este factor angiogénico por parte de las células A549, una línea celular de cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), y no se encontró diferencia en la expresión de este factor por efecto de la estimulación con el agente que incrementa AMPc. Las células A549 están emparentadas con las células alveolares tipo II (ATII); la falta de cambio de expresión de VEGF de las células A549 puede deberse a que el epitelio alveolar ya es una fuente rica de VEGF, del cual se han

observado concentraciones significativas durante el desarrollo y la maduración pulmonar, debido a la formación de capilares que se encuentran alrededor de los alveolos, fundamentales para el intercambio de gases, no obstante, el pulmón adulto continúa siendo una fuente importante de VEGF que contribuye a la estructura, mantenimiento e integridad del alveolo (Barratt y col., 2018; Kathiriya y col., 2020). Más aún, VEGF es fundamental para el crecimiento de las células ATII (células alveolares tipo II), estas células son la principal población en el epitelio alveolar y se han relacionado con la producción de surfactante, actúan como moduladores de la respuesta inmune innata, asimismo, son esenciales para la regeneración del mismo epitelio cuando existe un evento de lesión, entre otras funciones que ayudan a la homeostasis alveolar (Ruaro y col., 2021; Barratt y col., 2018).

También se abre la posibilidad de que falte algún estímulo para observar un cambio sustancial en la expresión de este marcador; por ejemplo, Chen y col. (2018b), demostraron que en células de adenocarcinoma pulmonar la activación de STAT3 aumenta la expresión de VEGF y, por lo tanto, la angiogénesis. Ramírez (2017) encontró que la inhibición competitiva de la hormona de crecimiento (GH), cuyas vías de señalización incluyen JAK-STAT, disminuye la expresión de VEGF, aunque la estimulación con 100 ng/mL de GH no genera el incremento encontrado por Chen y col. (2018b) al activar STAT3.

Por otro lado, la actividad biológica de VEGF depende de la unión al receptor VEGFR 1, 2 y 3 o de la unión a neuropilinas 1 y 2 que desencadena la transducción de señales mediante la activación de ERK 1 y 2 (quinasa regulada por señal extracelular) y a la subsecuente activación de AKT (proteína quinasa B) (Muench y col., 2019); estas vías a su vez regulan la migración, la supervivencia, el crecimiento y la transición epitelial-mesenquimal en las células cancerosas (Ma y col., 2019). Estudios recientes muestran que la inhibición con antagonistas de estas dos proteínas significativamente disminuye los niveles de VEGF (Muench y col., 2019; Ma y col., 2019) demostrando que río abajo de estas vías de señalización se desempeña un papel importante en la regulación de este factor angiogénico; en particular en NSCLC se ha reportado que niveles bajos en la expresión de VEGF llevan a la inhibición del crecimiento del tumor, la angiogénesis, invasión y migración

pero sobre todo promueven la muerte celular (Muench y col., 2019).

Queda claro que la complejidad de esta patología hace que sea difícil atacarla, pero a su vez resalta la importancia de conocer y entender el origen celular de cada tipo de cáncer pulmonar (Sarode y col., 2020; Chen y col., 2019; Rodríguez-Remírez y col., 2019). Los avances realizados hasta el momento soportan el utilizar a VEGF y sus receptores (VEGFR 1 y 2) como marcadores prometedores en el pronóstico de NSCLC, debido a que niveles elevados de estas proteínas se ha asociado a una baja supervivencia contrario a los pacientes que exhiben bajos niveles de VEGF y la expresión de un solo receptor (Ceci y col., 2020), lo que promueve el uso de terapias anti-angiogénicas (Rodríguez-Remírez y col., 2019). Aunado a los resultados encontrados en este estudio podemos acercarnos más a elucidar la biología y el comportamiento de las células A549 con fenotipo neuroendócrino para encontrar la mejor estrategia terapéutica para los pacientes.

7. CONCLUSIONES

En conclusión, en el presente estudio se proporciona evidencia que la isobutimetilxantina (IBMX) induce la diferenciación neuroendócrina *in vitro* de las células A549 de adenocarcinoma pulmonar. Además, se confirmó la expresión de VEGF de las células A549, pero no se observó una diferencia significativa con la expresión en las células neuroendócrinas. Podría investigarse a futuro el cambio en la expresión de VEGF en conjunto con otros estímulos, como, por ejemplo, la activación de STAT3 en las células A549NED.

8. BIBLIOGRAFÍA

Amano H, Matsui Y, Hatanaka K, Hosono K, Ito Y. VEGFR1-tyrosine kinase signaling in pulmonary fibrosis. *Inflammation and Regeneration*. **2021**; 41:1-8.

Barratt S, Flower V, Pauling J, Millar A. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) and Fibrotic Lung Disease. *Int J Mol Sci*. **2018**; 19:1269.

Berardi R, Torniai M, Partelli S, Rubini C, Pagliaretta S, Savini A, Polenta V, Santoni M, Giampieri R, Onorati S, Barucca F, Murrone A, Bianchi F & Falconi M. Impact of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) single nucleotide polymorphisms on outcome in gastroenteropancreatic neuroendocrine neoplasms. *Plos One*. **2018**;13: e0197035.

Ceci C, Atzori M, Lacal P, Graziani G. Role of VEGFs/VEGFR-1 Signaling and Its Inhibition in Modulating Tumor Invasion: Experimental Evidence in Different Metastatic Cancer Models. *Int. J. Mol. Sci*. **2020**; 21: 1388

Chan D, Clarke S, Diakos C, Roach P, Bailey D, Singh S & Pavlakis N. Prognostic and predictive biomarkers in neuroendocrine tumours. *Crit Rev Oncol Hematol*. **2017**;113: 268–282.

Chen L, Liu S, Tao Y. Regulating tumor suppressor genes: post-translational modifications. *Signal Transduct Target Ther*. **2020**; 5: 90.

Chen Y, Mathy NW, Lu H. The role of VEGF in the diagnosis and treatment of malignant pleural effusion in patients with non-small cell lung cancer (Review). *Mol Med Rep*. **2018a**;17: 8019-8030.

Chen X, Zheng Q, Li W, Lu Y, Ni Y, Ma L, Fu Y. SOX5 induces lung adenocarcinoma angiogenesis by inducing the expression of VEGF through STAT3 signaling. *Onco Targets Ther*. **2018b**; 11: 5733-5741.

Chen Y, Tang WY, Tong X, Ji H. Pathological transition as the arising mechanism for drug resistance in lung cancer. *Cancer Commun (Lond)*. **2019**; 39: 53.

Devarakonda S, Govindan R. Untangling the evolutionary roots of lung cancer. *Nat Commun.* **2019**; 10: 2979.

Drula R, Braicu C, Harangus A, Nabavi SM, Trif M, Slaby O, Ionescu C, Irimie A, Berindan-Neagoe I. Critical function of circular RNAs in lung cancer. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* **2020**; 11: e1592.

Duruiseaux M, Esteller M. Lung cancer epigenetics: From knowledge to applications. *Semin Cancer Biol.* **2018**; 51: 116-128.

Feng J, Sheng H, Zhu C, Qian X, Wan D, Su D, Chen X, Zhu L. Correlation of neuroendocrine features with prognosis of non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* **2016**; 7: 71727-71736.

Gallant J, Lovly C. Established, emerging and elusive molecular targets in the treatment of lung cancer. *J Pathol.* **2018**; 244: 565-577.

GLOBOCAN. Cancer Today. International Agency for Research on Cancer. Publicado **2018**. [Consultado 2020 noviembre 24]. Disponible en: <https://gco.iarc.fr/today/home>.

Guo S, Martin MG, Tian C, Cui J, Wang L, Wu S, Gu W. Evaluation of detection methods and values of circulating vascular endothelial growth factor in lung cancer. *J Cancer.* **2018**; 9: 1287-1300.

Hendifar A, Marchevsky AM, Tuli R. neuroendocrine tumors of the lung: current challenges and advances in the diagnosis and management of well-differentiated disease. *J Thorac Oncol.* **2017**; 12: 425-436.

Herbst R, Morgensztern D, Boshoff C. The biology and management of non-small cell lung cancer. *Nature.* **2018**; 553: 446–54.

Itatani Y, Kawada K, Yamamoto T, Sakai Y. Resistance to anti-angiogenic therapy in cancer-alterations to anti-VEGF pathway. *Int J Mol Sci.* **2018**; 19: 1232.

Jacob A, Vedaie M, Roberts D, Thomas D, Villacorta-Martin C, Alysandratos K, Hawkins F, Kotton D. Derivation of self-renewing lung alveolar epithelial type II cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* **2019**;14: 3303-3332.

Kashima J, Kitadai R, Okuma Y. Molecular and morphological profiling of lung cancer: a foundation for "next-generation" pathologists and oncologists. *Cancers (Basel).* **2019**; 11: 599.

Kathiriya J, Chapman H. VEGF Drives the Car toward Better Gas Exchange. *Dev Cell.* **2020**; 52: 546-547.

Khanmohammadi A, Aghaie A, Vahedi E, Qazvini A, Ghanei M, Afkhami A, Hajian A, Bagheri H. Electrochemical biosensors for the detection of lung cancer biomarkers: A review. *Talanta.* **2020**; 206: 120251.

Kyriakopoulos G, Mavroei V, Chatzellis E, Kaltsas G, Alexandraki K. Histopathological, immunohistochemical, genetic and molecular markers of neuroendocrine neoplasms. *Ann Transl Med.* **2018**; 6: 252.

Leiro-Fernández V, Mouronte-Roibás C, García-Rodríguez E, Botana-Rial M, Ramos-Hernández C, Torres-Durán M, Ruano-Raviña A, Fernández-Villar A; Lung Cancer Group at the Álvaro Cunqueiro Hospital in Vigo. Predicting delays in lung cancer diagnosis and staging. *Thorac Cancer.* **2019**; 10: 296-303.

Lv P, Wang W, Cao Z, Zhao D, Zhao G, Li D, Qi L, Xu J. Fsk and IBMX inhibit proliferation and proapoptotic of glioma stem cells via activation of cAMP signaling pathway. *J Cell Biochem.* **2019**; 120: 321-331.

Ma Y, Xiu Z, Zhou Z, Huang B, Liu J, Wu X, Li S, Tang X. Cytochalasin H Inhibits Angiogenesis via the Suppression of HIF-1 α Protein Accumulation and VEGF Expression through PI3K/AKT/P70S6K and ERK1/2 Signaling Pathways in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *J Cancer.* **2019**;10(9):1997-2005.

Malczewska A, Kidd M, Matar S, Kos-Kudła B, Bodei L, Oberg K, Modlin IM. An assessment of circulating chromogranin a as a biomarker of bronchopulmonary neuroendocrine neoplasia: a systematic review and meta-analysis. *Neuroendocrinology*. **2020**; 110: 198-216.

Marcoux N, Gettinger SN, O'Kane G, Arbour KC, Neal JW, Husain H, Evans TL, Brahmer JR, Muzikansky A, Bonomi PD, Del Prete S, Wurtz A, Farago AF, Dias-Santagata D, Mino-Kenudson M, Reckamp KL, Yu HA, Wakelee HA, Shepherd FA, Piotrowska Z, Sequist LV. EGFR-Mutant adenocarcinomas that transform to Small-Cell Lung Cancer and other neuroendocrine carcinomas: clinical outcomes. *J Clin Oncol*. **2019**; 37: 278-285.

Mendieta I, Nuñez-Anita R, Pérez-Sánchez G, Pavón L, Rodríguez-Cruz A, García-Alcocer G, Berumen L. Effect of A549 neuroendocrine differentiation on cytotoxic immune response. *Endocr Connect*. **2018**; 7: 791-802.

Muench D, Rezzoug F, Thomas S, Xiao J, Islam A, Miller D, Sedoris K. Quadruplex-forming oligonucleotide targeted to the VEGF promoter inhibits growth of non-small cell lung cancer cells. *PLoS One*. **2019**;14(1):e0211046.

Pandey A, Singhi E, Arroyo J, Ikizler T, Gould E, Brown J, Beckman J, Harrison D, Moslehi J. Mechanisms of VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) inhibitor-associated hypertension and vascular disease. *Hypertension*. **2018**; 71: e1-e8.

Peravali M, Wang H, Kim C, Veytsman I. Combined inhibition of EGFR and VEGF pathways in patients with EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: a systematic review and meta-analysis. *Curr Oncol Rep*. **2020**; 22: 119.

Ramírez A. Cambios en la expresión molecular de VEGF, PAI-1 y HIF1a en las células epiteliales alveolares A-549 expuestas a un antagonista derivado de la hormona de crecimiento. **2017**. Tesis MCQB-UAQ

Rodríguez-Remírez M, Del Puerto-Nevado L, Fernández Aceñero MJ, Ebrahimi-Nik H, Cruz-Ramos M, García-García L, Solanes S, Baños N, Molina-Roldán E, García-Foncillas J, Cebrián A. Strong Antitumor activity of Bevacizumab and Aflibercept in neuroendocrine carcinomas: In-Depth preclinical study. *Neuroendocrinology*. **2020**;110: 50-62.

Rossi G, Bertero L, Marchiò C, Papotti M. Molecular alterations of neuroendocrine tumours of the lung. *Histopathology*. **2018**; 72: 142-152.

Ruaro B, Salton F, Braga L, Wade B, Confalonieri P, Volpe MC, Baratella E, Maiocchi S, Confalonieri M. The history and mystery of alveolar epithelial type II cells: Focus on their physiologic and pathologic role in lung. *Int J Mol Sci*. **2021**; 22: 2566.

Sarode P, Mansouri S, Karger A, Schaefer MB, Grimminger F, Seeger W, Savai R. Epithelial cell plasticity defines heterogeneity in lung cancer. *Cell Signal*. **2020**; 65: 109463.

Shi X, Dong X, Young S, Chen AM, Liu X, Zheng Z, Huang K, Lu D, Feng S, Morahan G, Cai K. The impact of angiogenesis inhibitors on survival of patients with small cell lung cancer. *Cancer Med*. **2019**; 8: 5930-5938.

Testa U, Castelli G, Pelosi E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. **2018**;10: 248.

Uccella S, La Rosa S, Volante M, Papotti M. Immunohistochemical Biomarkers of Gastrointestinal, Pancreatic, Pulmonary, and Thymic Neuroendocrine Neoplasms. *Endocr Pathol*. **2018a**; 29: 150-168.

Uccella S, La Rosa S, Scaldaferrì D, Monti L, Maragliano R, Sorrenti E, Gariboldi M, Taramelli R, Sessa F, Acquati F. New insights into hypoxia-related mechanisms involved in different microvascular patterns of bronchopulmonary carcinoids and poorly differentiated neuroendocrine carcinomas. Role of ribonuclease T2 (RNASET2) and HIF-1 α . *Hum Pathol*. **2018b**; 79: 66-76.

Wang Z, Zhao Y, An Z, Li W. Molecular links between angiogenesis and neuroendocrine phenotypes in prostate cancer progression. *Front Oncol.* **2020** Jan 21;9: 1491.

Wolin E. Advances in the diagnosis and management of well-differentiated and intermediate-differentiated neuroendocrine tumors of the lung. *Chest.* **2017**; 151: 1141-1146.

Wu J, Tang Y, Liang X. Targeting VEGF pathway to normalize the vasculature: an emerging insight in cancer therapy. *Onco Targets Ther.* **2018**; 11:6901-6909.

Zhang H, Kong Q, Wang J, Jiang Y, Hua H. Complex roles of cAMP-PKA-CREB signaling in cancer. *Exp Hematol Oncol.* **2020**; 9: 32.

Zhao J, Shao J, Zhao R, Li R, Yu K, Zhu L, Zhang J. Histological evolution from primary lung adenocarcinoma harboring EGFR mutation to high-grade neuroendocrine carcinoma. *Thorac Cancer.* **2018**; 9: 129-135