

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Grado en Farmacia



**ESTUDIO DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE
CARDO MARIANO (*SILYBUM MARIANUM*) EN
EL TRATAMIENTO DE GLIOBLASTOMAS EN
MODELOS DE RATÓN.**

Autor: ROBERTO CASTRILLO PUENTE

Villaviciosa de Odón, a ***junio de 2023***

Título del Trabajo: Estudio del efecto del extracto de cardo mariano (*Silybum marianum*) en el tratamiento de glioblastomas en modelos de ratón.

Este trabajo ha sido realizado en la Unidad Funcional de Investigación de Enfermedades Crónicas (UFIEC) del Instituto de Salud Carlos III, en el grupo de NeuroOncología liderado por la doctora Pilar Sánchez Gómez. Su seguimiento se ha llevado a cabo por la Universidad Europea de Madrid.



Tutores: Pilar Sánchez Gómez y María Castelló Pons (ISCIII), e

Iván Fernández de Lamo (UEM).

“Me parece haber sido sólo un niño jugando en la orilla del mar, divirtiéndose y buscando una piedra más lisa o una concha más bonita de lo normal, mientras el gran océano de la verdad yacía ante mis ojos con todo por descubrir” (Isaac Newton).

ÍNDICE

ÍNDICE DE ABREVIATURAS	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
EL GLIOBLASTOMA	4
EL CARDO MARIANO (<i>SILYBUM MARIANUM</i>)	6
OBJETIVOS	11
MATERIALES Y MÉTODOS	11
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE MARCADORES VASCULARES Y MESENQUIMALES EN RESPUESTA A SILIBILINA.	14
ANÁLISIS MEDIANTE WB DE MARCADORES VASCULARES Y MESENQUIMALES EN RESPUESTA A SILIBILINA.	16
ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE MARCADORES INMUNES EN RESPUESTA A SILIBILINA.	18
ANÁLISIS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES INMUNES EN RESPUESTA A SILIBILINA.....	20
CONCLUSIONES	22
BIBLIOGRAFÍA	23
ANEXO A. MATERIAL COMPLEMENTARIO	28
ANEXO B. SOSTENIBILIDAD	30

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

Por orden alfabético:

ADN: ácido desoxirribonucleico

AIF: apoptosis-inducing factor

ANG1: Angiopoyetina 1.

ANG2: Angiopoyetina 2.

ARN: ácido ribonucleico

α SMA: Actina de músculo liso alfa.

BHE: Barrera Hematoencefálica.

CD11b: integrina alfa M, antígeno de macrófagos.

CD248: gen que codifica para la proteína endosialina, antígeno de pericitos.

CD3: del inglés Cluster of Differentiation 3, antígeno de linfocitos T.

DAB: diaminobencina.

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol, marcador fluorescente.

EGFR: Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico.

EMT: Transición epitelio-mesénquima.

F4/80: receptor de macrófagos.

GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

GBM: Glioblastoma.

GICs: Glioma Initiating Cells.

HRP: peroxidasa de rábano.

H&E: hematoxilina y eosina

IDH: Isocitrato Deshidrogenasa.

MDSCs: Células supresoras de origen mieloide.

NF- κ B: Factor Nuclear potenciador de cadenas kappa ligeras de células B activadas.

OMS: Organización Mundial de la Salud

PDGFR β : Receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PI3K: Fosfoinositida 3-cinasa.

PBS: del inglés Phosphate-buffered Saline, tampón fosfato salino.

PTEN: del inglés Phosphate and Tensine homolog, proteína homóloga de fosfato y tensina.

qRT-PCR: quantitative real-time Polymerase Chain Reaction, PCR cuantitativa en tiempo real.

STAT3: Signal Transducer and Activator of Transcription 3.

TAMs: monocitos/macrófagos asociados al tumor.

TANs: neutrófilos asociados al tumor.

TAZ: Tafazzina.

TERT: Transcriptasa inversa telomerasa.

TGF β : factor de crecimiento transformante beta

TME: Microambiente Tumoral.

TMZ: Temozolomida.

Treg: linfocitos T reguladores.

VEGFR: vascular endothelial growth factor receptor.

WB: Western Blot.

RESUMEN

El glioblastoma es uno de los tipos de tumores cerebrales más agresivos y letales. A pesar de los avances en el tratamiento, el pronóstico de los pacientes con glioblastoma sigue siendo malo, debido principalmente a su agresividad y a su resistencia a las terapias actuales. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de identificar nuevas opciones terapéuticas para esta devastadora enfermedad. La silibinina es un flavonoide natural que se encuentra en el extracto de cardo mariano y que ha demostrado poseer propiedades anticancerígenas, incluso en células de glioblastoma. En este proyecto, investigamos el efecto de la silibinina sobre la expresión de varios genes clave implicados en la progresión del glioblastoma en modelos murinos con el fin de detectar cómo se produce su potencial terapéutico. Para ello, se realizaron diferentes experimentos como qRT-PCR, WB e inmunohistoquímica. En base a los resultados obtenidos, se sugiere que la silibinina puede aumentar la infiltración de linfocitos en el área tumoral, al inhibir la transición epitelio-mesénquima, lo que podría significar una mejor prognosis en los ratones tratados con silibinina respecto a los controles sin tratar.

Palabras clave: glioblastoma, silibinina, cardo mariano, linfocito, transición epitelio-mesénquima, microambiente tumoral.

ABSTRACT

Glioblastoma is one of the most aggressive and lethal types of brain tumors. Despite advances in treatment, the prognosis of patients with glioblastoma remains poor, mainly because of its aggressiveness and resistance to current therapies. Therefore, there is an urgent need to identify new therapeutic options for this devastating disease. Silybin is a natural flavonoid found in milk thistle extract that has been shown to possess anticancer properties, including the ability to inhibit the growth of glioblastoma cells. In this project, we investigated the effect of silybin on the expression of several key genes involved in glioblastoma progression in murine models to characterize how its therapeutic potential occurs. For this purpose, different experiments such as qRT-PCR, WB and immunohistochemistry were performed. Based on the results obtained, it is suggested that silybin may increase lymphocyte infiltration in the tumor area by inhibiting the epithelial-mesenchymal transition, which could mean a better prognosis in mice treated with silybin compared to untreated controls.

Keywords: glioblastoma, silybin, milk thistle, lymphocyte, epithelial-mesenchymal transition, tumor microenvironment.

INTRODUCCIÓN

EL GLIOBLASTOMA

Los avances tecnológicos de las dos últimas décadas han mejorado sustancialmente nuestra comprensión de la biología del cáncer y han permitido desarrollar tratamientos específicos y eficaces para varios de los tumores más comunes, como los de mama y próstata. Sin embargo, estos diseños terapéuticos no han tenido éxito para la mayoría de los tumores cerebrales, en particular para los gliomas difusos, tumores neuroepiteliales de origen glial que siguen teniendo uno de los peores pronósticos. Aunque estos representan un pequeño porcentaje de todos los cánceres, los gliomas constituyen los tumores cerebrales primarios más frecuentes y son uno de los tipos de cáncer más temidos, ya que más de dos tercios de los adultos diagnosticados morirán en los dos años siguientes al diagnóstico, lo que lo convierte en una de las diez neoplasias oncológicas más mortales [1,2].

Dentro de los gliomas se incluyen los astrocitomas, que histológicamente se asemejan a los astrocitos, y los oligodendrogliomas, similares a los oligodendrocitos. Todos ellos se caracterizan por su naturaleza difusa, aunque la Organización Mundial de la Salud (OMS) los clasifica desde los menos agresivos de grado II, hasta los glioblastomas (GBM), que son gliomas de grado IV cuya mediana de supervivencia global es de aproximadamente 15 meses [3]. Los GBM son los tumores cerebrales malignos más agresivos, frecuentes y vascularizados del sistema nervioso central, y generalmente muestran una rápida evolución pre y postoperatoria. Desde el punto de vista histológico, los GBM tienen características astrocíticas, baja diferenciación celular, un índice mitótico y proliferativo alto con diseminación intracraneal, elevada heterogeneidad celular y áreas abundantes de necrosis asociadas a hipoxia y proliferación microvascular (neovascularización) aberrante, así como una fuerte supresión del sistema inmune con presencia frecuente de células mieloides [4]. Aparecen en individuos adultos principalmente, pero también ocurren en niños, representando la segunda causa de muerte por cáncer entre niños y adolescentes [5]. Este dramático comportamiento se ha atribuido a la alta invasividad y tasa de proliferación que exhiben estos tumores. Además, el GBM es muy resistente a la radioterapia y a la quimioterapia estándar. Estas características podrían explicarse en parte por la presencia de una pequeña subpoblación de células en el interior de la masa tumoral, denominadas Glioma Stem-like Cells o Glioma Initiating Cells (GICs) por su similitud con las células madre normales y su capacidad para iniciar y mantener el crecimiento tumoral [6-8].

El GBM no se compone únicamente de células tumorales, sino que éstas conviven con multitud de otros tipos celulares no cancerígenos creando un ambiente que promueve el crecimiento, el mantenimiento y la supervivencia del tumor, lo que se denomina microambiente tumoral (TME, del inglés Tumor MicroEnvironment). En concreto el TME de los GBMs se compone de astrocitos reactivos, fibroblastos, células inmunes, células endoteliales y pericitos vasculares, además de biomoléculas no proteicas y proteínas producidas por todos estos tipos celulares [9]. Las células del glioma mantienen una estrecha relación con el estroma que las rodea, en particular con la vasculatura. Para progresar a tumores de mayor grado, producen varios factores solubles que inducen la proliferación endotelial y dan forma a los nuevos vasos. Además, las células tumorales contribuyen directamente a la neovasculatura mediante un proceso de mimetismo vascular [10]. Las células inmunitarias constituyen otro componente importante del microentorno del glioma y pueden alcanzar hasta el 50% del contenido de la masa tumoral en algunos tumores. Recientes estudios sobre el cáncer han subrayado las características tan especiales del compartimento inmunitario en los gliomas, enriquecido en células mieloides con fuertes propiedades inmunosupresoras y escasez de linfocitos [11]. Una amplia variedad de moléculas angiogénicas y citocinas ejercen un efecto simultáneo sobre el endotelio y los leucocitos tumorales. Además, los cambios en la función de la vasculatura tumoral afectan a la entrada de células inmunes y/o a sus propiedades inmunosupresoras [12].

Los gliomas presentan distintos perfiles transcriptómicos, que discriminan entre tumores clásicos (CL), mesenquimales (MES), neurales (N) y proneurales (PN) [13]. También se sabe que las células de glioma pueden transdiferenciarse en células endoteliales (mimetismo vascular) o pericíticas debido a su gran plasticidad [14-16], provocando graves efectos en la vasculatura. Asimismo, se ha observado que la mayoría de los pericitos vasculares en gliomas agresivos derivan de células tumorales [14,17]. El proceso de tumor a pericito se ha relacionado con la señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF β) [14] y puede estar impulsado por la vía del NF- κ B (factor nuclear potenciador de cadenas kappa ligeras de células B activadas) y TAZ (tafazzina) en respuesta a la activación del EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) e implica la adquisición de características mesenquimales, incluida la secreción de factores proangiogénicos [17].

Estudios genómicos y transcriptómicos han permitido determinar las principales alteraciones genéticas en los tumores gliales, distinguiendo entre gliomas con mutaciones en el gen isocitrato

deshidrogenasa (IDH)1/2, que se encuentra en los gliomas de grado II y III y en los GBM menos agresivos; y los gliomas IDHwt, que incluyen casi todos los GBM y tienen un peor pronóstico [18]. En los GBM-IDHwt son frecuentes las mutaciones que activan vías de señalización descendentes de receptores tirosina quinasa, principalmente EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Además, estos tumores se asocian normalmente con la activación de la vía PI3K (fosfoinositida 3-cinasa) por inactivación de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN) o activación directa de PI3K, mutaciones en el promotor de TERT (transcriptasa inversa telomerasa) y pérdida de reguladores del ciclo celular como p16 y p19 [19]. Como consecuencia de estas alteraciones, es frecuente encontrar en los GBM la activación del factor de transcripción STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3), que promueve la transformación glial, modula el metabolismo y favorece la supervivencia de las células tumorales. Esta vía también se ha relacionado con la inducción de fenotipos mesenquimales más agresivos en los gliomas. Además de estos efectos directos, la activación de STAT3 se ha relacionado con alteraciones en el microambiente tumoral que también promueven la agresividad de los GBMs. Así, se ha relacionado con la inducción del fenotipo inmunosupresor de los gliomas (y otros tipos de cáncer), a través de la estimulación auto- y paracrina de la vía STAT3 en células mieloides [20].

Los tratamientos actuales contra el GBM incluyen la resección quirúrgica del tumor (a menudo solo parcial, según la proximidad de la masa tumoral a regiones cerebrales elocuentes o motoras, esto es, a aquellas áreas corticales específicas que tienen determinadas funciones cerebrales de alta expresividad), la radioterapia focal [6,7] y el tratamiento con diferentes agentes quimioterápicos, siendo el más utilizado el agente alquilante temozolomida (TMZ) [5,21]. Todos estos tratamientos tienen una eficacia limitada, por lo que es crucial desarrollar nuevas estrategias terapéuticas que ayuden a combatir más eficazmente esta enfermedad. En este contexto de buscar nuevas terapias prometedoras surge la opción de explorar el tratamiento con el extracto de cardo mariano.

EL CARDO MARIANO (*SILYBUM MARIANUM*)

Silybum marianum (L.) Gaertner, conocido popularmente como cardo mariano, es una planta medicinal perteneciente a la familia *Asteraceae* que se ha utilizado desde la antigüedad en la medicina tradicional para tratar diversas dolencias por sus propiedades antioxidantes y

antiinflamatorias. Es una planta anual invasora que se encontraba originalmente en la cuenca mediterránea, pero ahora está presente en todos los continentes. Requiere suelos secos y cálidos y es muy competitiva eliminando otras plantas [22].

Durante siglos se han usado sus frutos (llamados aquenios, similares a semillas) para tratar enfermedades hepáticas y gastrointestinales por su capacidad para proteger el hígado y promover la regeneración celular. Esto se debe a que, según diferentes estudios, el extracto de cardo mariano obtenido de estas semillas secas contiene varios principios activos (conocidos como silimarina) que han demostrado que pueden ayudar a proteger el hígado de los daños causados por toxinas y sustancias químicas, a reducir su inflamación y promover la regeneración celular, lo que puede ser útil en el tratamiento de enfermedades hepáticas crónicas como la cirrosis y la hepatitis y daños inducidos por el alcohol [23-25].

El extracto obtenido de las semillas de *Silybum marianum* contiene un 70-80% de flavolignanos aproximadamente y entre un 20% y un 30% de una fracción químicamente indefinida compuesta por otros polifenólicos. La fracción conocida como silimarina es la mezcla de isómeros de flavolignanos estructuralmente relacionados, formada por: silibina o silibinina, isosilibinina, silidianina, silicristina, isosilicristina y taxifolina [26,27].

El principal componente de la silimarina es la silibinina (**Figura 1**), que es el más abundante y activo y está formado por cantidades iguales de silibinina A y silibinina B (CAS 22888-70-6). Aunque muchos informes antiguos utilizan indistintamente uno u otro término, no son sinónimos, lo que puede dar lugar a cierta confusión. Sólo los extractos de silimarina están disponibles en farmacias, mientras que los investigadores suelen utilizar la silibinina para sus experimentos. Este extracto se obtiene comprimiendo las semillas secas, lo que provoca una pérdida de lípidos. A continuación, el componente principal activo se extrae con acetona, metanol, etanol o acetato de etilo. Tras una segunda extracción de lípidos e impurezas, lo que queda es la mezcla de flavolignanos llamada silimarina, y la silibina se obtiene finalmente a partir de la silimarina mediante extracción metanólica [28].

**Cardo
Mariano**



Peso molecular: 482,12 Da

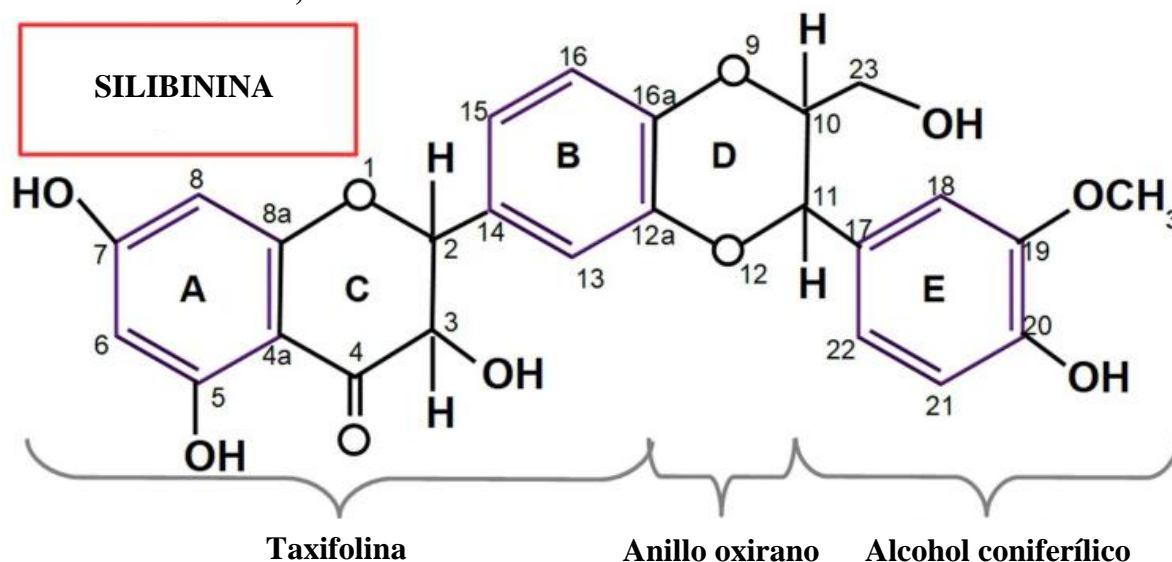


Figura 1. Cardo mariano y estructura química de la silibina (C₂₅ H₂₂ O₁₀), con su numeración. Cabe destacar la similitud entre la silibina y las hormonas esteroideas. El panel inferior muestra la fórmula estructural de la silibina, donde se pueden identificar 3 grupos químicos diferentes: una taxifolina y un alcohol coniferílico unidos por un anillo oxirano. Según Biedermann et al, [29] "se estableció que el grupo 20-OH es la fracción más activa de barrido de radicales y también el grupo más importante responsable de la actividad inhibidora de la lipoperoxidación". Las posiciones 2-3 también desempeñan un papel en la actividad antioxidante porque estas posiciones pueden oxidarse para producir 2-3 dehidrosilibina. La silibina tiene 5 grupos hidroxilo en posiciones 3, 5, 7, 20 y 23, que son las dianas para producir derivados de la silibina. Las posiciones 7 y 20 son lugares habituales de glucuronización de la silibina durante su conjugación en el metabolismo humano.

La silibina ha mostrado tener efectos antitumorales en varios tipos de cáncer. Estudios clínicos preliminares han demostrado que la silibina es capaz de llegar al cerebro del paciente, inhibiendo STAT3 en tumores metastásicos, factor que se ha demostrado su relevancia en la transcripción de los astrocitos reactivos que rodean a los tumores, deteniendo total o parcialmente el crecimiento del tumor [30]. En base a esto, con el proyecto iniciado por la Dra. Pilar Sánchez Gómez se pretendía analizar si la silibina era capaz de frenar el crecimiento de los GBM y de sinergizar con la TMZ utilizando modelos murinos.

Para ello, se decidió evaluar el crecimiento de una línea celular de glioma de ratón denominada GL261, en modelos de ratones inmunocompetentes. Aunque estas células no portan ninguna mutación del EGFR, sí expresan altos niveles de fosfo-STAT3, al menos en el contexto tumoral (**Figura 2A**). Se inyectaron 50000 células en el cerebro de ratones C56/BL6 y 3 días después se empezó a tratar a los animales con 100mg/Kg/día (5 días a la semana) de silibinina por vía intragástrica en presencia o en ausencia de TMZ (10mg/Kg/día) (5 días a la semana), administrada por vía intraperitoneal. Como las células GL261 expresan el reportero de luciferasa, se pudo monitorizar el crecimiento tumoral in situ con un equipo IVIS. El análisis de la luminiscencia dos semanas después de la inyección del tumor mostró una reducción significativa del crecimiento del GBM en los animales tratados sistémicamente con TMZ o con TMZ y Silibinina (**Figura 2B-C**). Además, las curvas de supervivencia confirmaron el efecto antitumoral de la quimioterapia convencional (**Figura 2D**). La silibinina no synergizó con la TMZ, aunque tampoco interfirió en su efecto ni produjo ninguna toxicidad añadida evidente. Cabe destacar que el tratamiento sistémico con silibinina sola también fue capaz de frenar el crecimiento de GL261 en los ratones (**Figura 2D**).

Posteriormente, se realizó una caracterización de los tumores control y de los tratados con silibinina. Aunque no se observó ninguna disminución clara de los niveles de fosfo-STAT3, sí se observó que los tumores tratados con silibinina eran menos hemorrágicos que los controles (**Figura 2F**). De acuerdo con esto, los tumores mostraron una menor cantidad de vasos aberrantes y dilatados (**Figura 2G**) y una menor rotura de la barrera hematoencefálica (medida como extravasación de IgG en el tumor) (**Figura 2H**) en presencia de silibinina. Estos resultados sugieren que los extractos de cardo mariano reducen la agresividad de los GBM en los modelos inmunocompetentes a través de la modulación de la vasculatura tumoral. Quedaba por determinar si se trata de un efecto directo de los vasos tumorales o si está mediado por cambios en los componentes neoplásicos o en otros componentes de apoyo al tumor, como por ejemplo las células inmunitarias, aspectos que se analizarán en este proyecto. Es interesante destacar que, al contrario de lo observado en el modelo murino de GL261, la silibinina no inhibió el crecimiento de la línea 12O89, derivada de una muestra de paciente y que también expresa niveles elevados de fosfo-STAT3 (datos no mostrados), pero que sólo se puede crecer en el cerebro de ratones que tienen el sistema inmunitario suprimido, los denominados ratones “nude”. Esto refuerza la hipótesis de partida de que el extracto de cardo mariano podría estar ejerciendo una acción anti-tumoral a través de cambios en el sistema inmune.

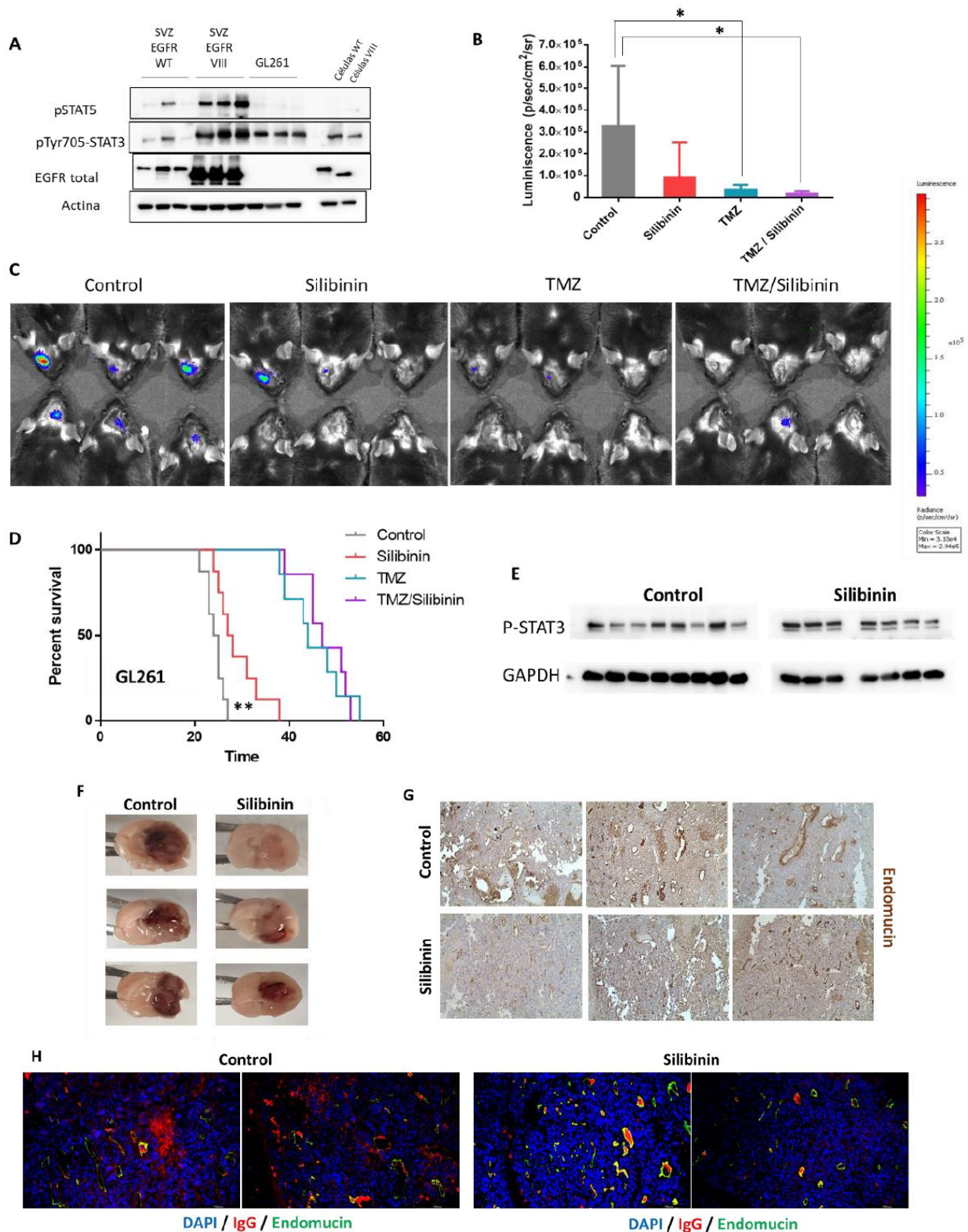


Figura 2. Análisis del efecto de la silibinina en el modelo de glioma GL261. A) Análisis por Western Blot (WB) de fosfo-STAT5, fosfo-STAT3 y EGFR en aloinjertos de glioma de ratón. Los modelos de SVZ se describieron previamente [31]. La actina se utilizó como control de carga. B-C) Cuantificación de la luminiscencia emitida por ratones inyectados con GL261 tras el tratamiento sistémico con PBS-BSA (control), silibinina, temozolomida (TMZ) y silibinina + TMZ, previa inyección del sustrato luciferina por vía intraperitoneal. En C se muestran imágenes representativas de los ratones obtenidas en el IVIS.

D) Análisis de supervivencia de Kaplan-Meier de ratones C57/BL6 que fueron inyectados intracranealmente con células GL261 y tratados con vehículo (control), silibinina, temozolomida (TMZ) y silibinina + TMZ. E) Análisis por WB de fosfo-STAT3 en extractos tumorales de D. F) Imágenes representativas de los cerebros de ratones C57/BL6 portadores de tumores GL261 tratados con vehículo (control) o silibinina. G) Imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica (IHC) de endomucina, que marca las células endoteliales, en secciones tumorales procedentes de D. H) Tinción de inmunofluorescencia representativa de IgG y endomucina en secciones tumorales procedentes de D. Los núcleos se detectaron mediante tinción con DAPI (azul). ** $P \leq 0,01$

OBJETIVOS

La finalidad de este proyecto es profundizar en el estudio de cómo afecta la silibinina al desarrollo y progresión tumoral y a su microambiente, partiendo de los resultados de investigaciones previas realizadas por el equipo dirigido por la Dra. Pilar Sánchez Gómez, sobre modelos murinos de GBM, y entender su función como posible fármaco terapéutico para este tipo de tumores cerebrales. Para ello se han propuesto los siguientes objetivos:

- Observar el efecto de la silibinina sobre el control del microambiente tumoral en un modelo murino de GBM, el generado por alotrasplante intracraneal de células GL261.
- Analizar las diferencias vasculares y de respuesta inmunitaria entre controles y tratados con silibinina en el modelo murino de GBM.
- Investigar la posible correlación entre la presencia de silibinina y las diferencias halladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras utilizadas: Para realizar los análisis de este proyecto se utilizaron las muestras de material tumoral procedentes del experimento de la **Figura 2**. Por una parte, el material congelado en fresco se utilizó para los análisis de qRT-PCR y WB, mientras que para el análisis histológico se utilizaron muestras de tumores embebidas en parafina.

Análisis de los tumores mediante inmunohistoquímica: Para el análisis histológico, los tumores se fijaron en paraformaldehído (PFA) al 4% durante 3 horas a 4°C y se embebieron en

parafina. Seguidamente se utilizó un micrótopo para obtener secciones de los tumores que fueron colocadas en portaobjetos. Las muestras obtenidas fueron desparafinadas (45 minutos a 65°C) y rehidratadas. A continuación, fueron tratadas con citrato 10nM pH6 para lograr el desenmascaramiento antigénico, e incubadas con una mezcla de tampón fosfato salino (PBS) a 0.1 M y tritón al 1% (agente humectante) en agitación para lograr la permeabilización de las membranas. Tras un bloqueo de 1h con tampón de bloqueo: PBS 0.1M + tritón 0.1% + albúmina de suero bovino al 5% + suero bovino fetal al 10%, las secciones tumorales fueron incubadas con el anticuerpo primario anti CD3 (**Tabla A3**) a 4°C durante toda la noche.

Al día siguiente se incubaron con el anticuerpo secundario correspondiente (anti-rabbit), durante 2 horas, a temperatura ambiente y en oscuridad. Para visualizar la señal generada, los anticuerpos secundarios empleados (listos para usar, DAKO) están conjugados con peroxidasa de rábano (HRP), que reacciona con un sustrato colorimétrico, la diaminobenzidina (DAB). Este se agrega a la muestra de tejido produciendo un precipitado marrón que se deposita donde se encuentran los anticuerpos, permitiendo identificar y localizar visualmente la proteína de interés. A continuación, los cortes se trataron con hematoxilina y eosina (H&E) para identificar la estructura celular y tisular. Finalmente, las muestras se deshidrataron sumergiéndolas en soluciones de alcohol con concentraciones crecientes (70%, 80%, 90%, 100%), se aclaran en xileno y se montan para preservarla y observarla al microscopio. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Leica (20x) y analizadas con el programa de análisis de imagen ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>) para cuantificar CD3.

Análisis de expresión génica por medición de ARN mensajero - PCR cuantitativa con transcriptasa inversa: Partiendo del tejido tumoral seccionado del cerebro de los ratones modelo, se realizaron extracciones de ARN y fue digerido por DNasa I empleando un kit comercial de Roche y siguiendo las instrucciones del fabricante. Asimismo, la síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante retro-transcripción se realizó con el kit Prime Script RT reagent kit (PCR real time) (Takara).

Las reacciones de PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR, del inglés *quantitative real time polymerase chain reaction*) se realizaron en placas de 96 pocillos utilizando un termociclador Light Cycler 1.5 de Roche con SYBR Green (SYBR Premix Ex Taq, Takara) y empleando los cebadores respectivos. La expresión génica relativa fue cuantificada mediante el método doble delta Ct, utilizando los niveles de expresión del gen *Actina* como control interno de expresión.

Análisis de la expresión proteica por Western Blot (WB): Para la extracción de proteínas totales se resuspendieron las muestras de tejido tumoral en tampón de extracción ABDALA (50 mM Tris (pH 7.5), 300 mM NaCl, 0.5% SDS, and 1% Triton X-100) e incubándolas en termobloque con agitación a 900 rpm a 99°C por 15 minutos. A continuación, se centrifugaron los extractos a 14.000 g durante 15 minutos a temperatura ambiente y la concentración de proteínas se determinó a través de una prueba colorimétrica utilizando un kit comercial (BCA Protein Assay Kit). Aproximadamente 15µg de proteína de cada muestra se cargaron en geles de acrilamida SDS-PAGE al 10% y, una vez corrida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Hybond-ECL, Amersham Biosciences). Las membranas fueron teñidas con rojo Ponceau para verificar la eficacia de la transferencia, así como la carga homogénea de la misma cantidad proteica de cada muestra. Seguidamente se bloquearon en PBS con Tween 1% y leche en polvo descremada al 5% durante 1 hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubaron con su correspondiente anticuerpo primario (**Tabla A2**) diluido en PBS-Tween hasta el día siguiente a 4°C. Posteriormente las membranas se incubaron durante unas 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario respectivo (anticuerpo DAKO conjugado con HRP contra ratón o conejo, en disolución 1:5000). Por último, el revelado de las membranas se realizó con un generador de imágenes Amersham™ Imager 600, aumentando la señal quimio-luminiscente con el agente de detección comercial ECL de Pierce.

Análisis estadístico: El análisis estadístico fue realizado utilizando el software GraphPad Prism 5 para la presentación de los datos y el análisis estadístico. Debido a que el tamaño de la muestra (N) es menor a 50, se realizó la prueba de Shapiro-Wilk para evaluar la normalidad de la distribución en la población. Los resultados mostraron un valor de p mayor a 0.05, confirmando que nuestra muestra sigue una distribución normal. Por lo tanto, para los gráficos de barras, se utilizó una prueba t de Student independiente de dos colas para determinar el nivel de significancia, y la prueba F se utilizó para comparar las varianzas. Se consideraron como significativos aquellos valores de p inferiores a 0.05 (*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001).

Disponibilidad de los datos: El autor confirma que los datos que respaldan las conclusiones de este estudio están disponibles en el artículo y en su material suplementario. Los detalles metodológicos adicionales, incluida una lista de los cebadores utilizados para el análisis por PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR, **Tabla A1**), y de los anticuerpos utilizados para la inmunohistoquímica y Western Blot (**Tabla A2** y **Tabla A3**), se proporcionan en los anexos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE MARCADORES VASCULARES Y MESENQUIMALES EN RESPUESTA A SILIBILINA.

Mediante qRT-PCR se estudiaron los niveles de expresión de diferentes biomarcadores relacionados con el TME en ratones tratados con silibinina y en ratones sin tratar (control). El biomarcador de referencia utilizado fue la *Actina*. En primer lugar, con el fin de investigar posibles cambios en la vasculatura, se examinó la expresión de una selección de genes previamente identificados debido a su relación con la función de los pericitos o su asociación con la composición y estabilidad de la barrera hematoencefálica (BHE). Los genes analizados incluyeron: *Cd31*, *Vegfr2*, *Ang1*, *Ang2*, *Pdgfr β* , *Cd248*, *α Sma*, *Aif*, *Snai1*, *Serpine1*, *Taz* y *Cd44* [31].

Los resultados obtenidos que se muestran en la **Figura 3** indican que se obtuvieron diferencias significativas en la expresión de *α Sma*, *Serpine1*, *Taz* y *Cd44*. El gen *Serpine1* es un gen que codifica para una serina proteasa citoplásmica secretada en procesos de coagulación sanguínea y que desempeña un papel crítico en la regulación del activador tisular del plasminógeno y de los inhibidores del activador del plasminógeno. *Cd44* es una glicoproteína de la membrana celular, es un receptor transmembrana del hialuronano que se encuentra aumentado en el cáncer de mama y en muchos otros tumores, debido a la estimulación del factor de crecimiento epidérmico. La unión de *Cd44* con el hialuronano desencadena una importante señalización protumoral desde su segmento intracelular, induciendo la supervivencia de las células cancerosas [32,33]. *Cd31* es un marcador común del endotelio de la BHE y, por otro lado, la actina de músculo liso alfa (*α Sma*) y *Cd248* son biomarcadores de pericitos. *α Sma* de hecho es una proteína citoesquelética y contráctil que permite funcionar a los pericitos como células musculares que regulan el flujo sanguíneo cerebral (FSC). Los pericitos también expresan múltiples proteínas de membrana, como *Pdgfr β* (receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas). La regulación al alza de estas proteínas indica progresión en los gliomas al facilitar la formación de pseudópodos y remodelar el citoesqueleto para ganar motilidad e invadir células cancerosas [34], por lo que la disminución de la expresión que se observa es favorable al impedir estos acontecimientos y sugiere un mejor pronóstico [35].

Además, se sabe que *αSma*, *Taz* y *Snail* son genes que intervienen en la transición epitelio-mesénquima (EMT). La EMT es un proceso por el cual las células epiteliales adquieren características mesenquimales, lo que les permite volverse más migratorias e invasivas. En el contexto del cáncer, se cree que la EMT desempeña un papel en la progresión tumoral, invasividad y la metástasis al permitir a las células cancerosas invadir los tejidos circundantes y penetrar en el torrente sanguíneo o el sistema linfático, y se ha relacionado con resistencia al tratamiento (quimioterapia y radioterapia). *Snail* es un factor de transcripción conocido por su capacidad represora sobre la E-cadherina, proteína que ayuda a mantener la adhesión célula-célula. Se ha observado que los niveles de *Snail* tienden a aumentar cuando las células presentan un menor grado de diferenciación. El descenso de *Snail* indica un grado patológico más bajo en la progresión de la enfermedad. La regulación a la baja de estos genes sugiere que la silibinina podría inhibir el proceso EMT y suprimir la invasión y migración de células de GBM, al igual que parece hacer en otros tejidos malignos [36-38], promoviendo características epiteliales e inhibiendo características mesenquimales como confirma el descenso de *αSma*, lo que conllevaría a una supresión de la invasión y migración de células de glioblastoma, disminuyendo su resistencia a quimioterapia y radioterapia.

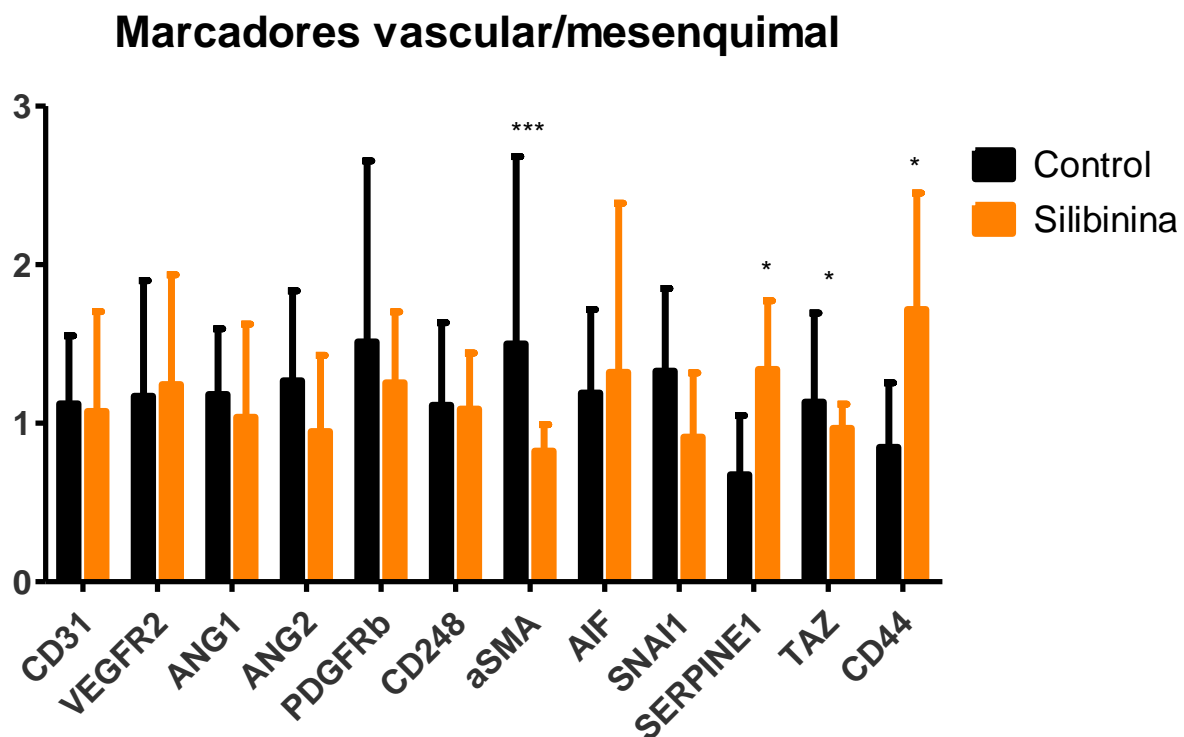


Figura 3. Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de marcadores vasculares y mesenquimales. Se utilizó como control de carga *Actina*. En este gráfico de barras se representan los resultados obtenidos con sus desviaciones estándar, con un nivel de significación * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

La angiopoyetina-1 (*Ang1*) es fundamental para la maduración, adhesión y supervivencia de los vasos sanguíneos. La angiopoyetina-2 (*Ang2*), en cambio, promueve la muerte celular e interrumpe la vascularización, por lo que desempeña un papel central en enfermedades relacionadas con la permeabilidad vascular y la angiogénesis. En condiciones fisiológicas normales, los niveles de *Ang2* son bajos, pero se elevan durante la inflamación o el cáncer. *Ang2* actúa sobre las células endoteliales, aumentando la permeabilidad endotelial, e induciendo la angiogénesis aberrante en los tumores y la metástasis [39-41].

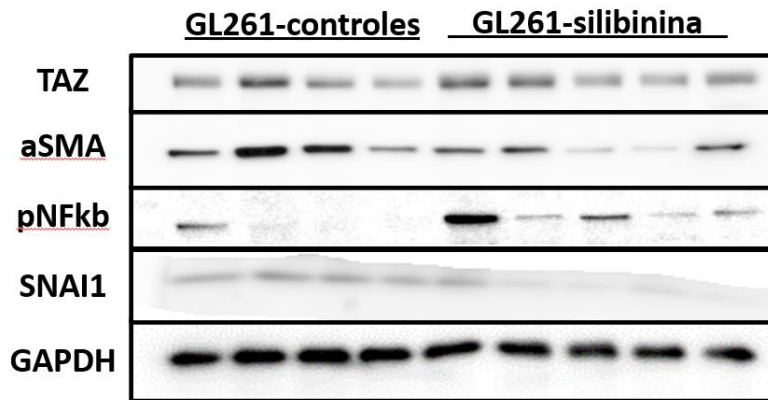
Por tanto, la tendencia que se observa en la disminución en la expresión génica de la ratio *Ang2/Ang1* (**Ilustración A1**) y de *Pdgfrβ* podría sugerir que la silibinina tuviera cierto efecto inhibitorio de la angiogénesis en los glioblastomas, aunque no fue una diferencia significativa la obtenida por lo que más estudios con una muestra ampliada serían necesarios para determinar este efecto.

ANÁLISIS MEDIANTE WB DE MARCADORES VASCULARES Y MESENQUIMALES EN RESPUESTA A SILIBILINA.

Con la intención de profundizar en los posibles efectos del fármaco sobre el microambiente tumoral y para confirmar la reducción de los marcadores mesenquimales, se realizó mediante la técnica de Western-Blot (WB) la cuantificación de las proteínas TAZ, α SMA, pNFK β y SNAI1, comparándolas respecto a la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en los tumores GL261 (objeto de nuestro estudio) cuyo resultado se muestra en la **Figura 4**.

Para ello, se realizó posteriormente al WB un estudio de densitometría con el fin de evaluar los cambios en los niveles de proteínas en las muestras control y tratadas con silibinina, usándose como control interno de carga la expresión de GAPDH, que está presente en el citosol de células eucariotas y se encarga de catalizar una de las reacciones más importantes de la glucólisis. Material adicional se encuentra disponible en la **Ilustración A2**.

A)



B)

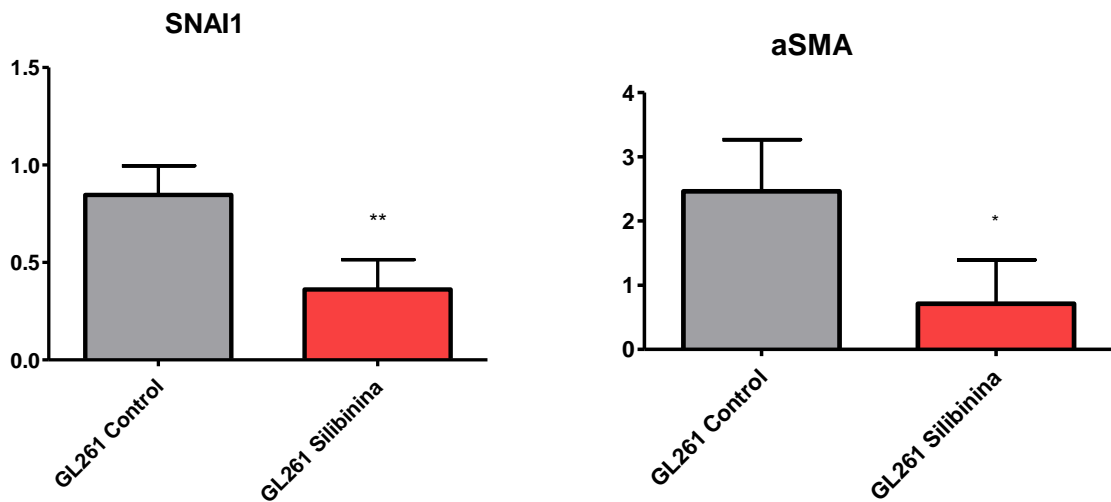


Figura 4. Análisis por Western-Blot (WB) de TAZ, α SMA, pNF κ B y SNAI1 en gliomas de ratón. Se utilizó como control de carga GAPDH. En A, imagen representativa del WB para analizar la expresión de estas proteínas en los extractos de tumores control y tratados con silibinina, se observan los resultados del marcaje por anticuerpos. En B, la cuantificación realizada por densitometría del WB en A utilizando el programa ImageJ, con un nivel de significación * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$.

Mediante este estudio pudimos corroborar que los resultados de expresión génica se relacionan con los de la cuantificación de proteínas, ya que en la línea GL261 se puede observar que en los ratones tratados con silibinina disminuye la cantidad de SNAI1 y de α SMA de forma significativa; mientras que no observamos cambios significativos en los niveles de fosfo-NF- κ B, la forma fosforilada del factor de transcripción NF- κ B, que interviene en diversos procesos celulares, como la inflamación o la supervivencia celular, y que estudios anteriores han demostrado que la activación de esta vía de señalización está implicada en el desarrollo y la progresión del glioblastoma.

Estos hallazgos, junto con los resultados previos, sugieren que los GBMs tratados con silibinina son menos mesenquimales, por lo que deberían ser menos angiogénicos y tener menos rotura de la BHE. De todas formas, cabe señalar que varios factores pueden influir en el comportamiento de las células de GBM al ser tumores altamente heterogéneos, por lo que más estudios serían necesarios para confirmar lo expuesto anteriormente.

ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL DE MARCADORES INMUNES EN RESPUESTA A SILIBILINA.

Por otro lado, se analizaron cambios en los niveles de expresión de genes relacionados con la actividad inmunitaria presente en el microambiente del tumor; puesto que los GBMs contienen una gran variedad de células inmunes entre los que se encuentran fundamentalmente linfocitos T reguladores (Treg), monocitos/macrófagos asociados al tumor (TAMs), neutrófilos asociados al tumor (TANs) y células supresoras de origen mieloide (MDSCs), predominando las células inmunosuprimidas. Se ha visto que dentro del tumor las células inmunes que logran penetrar a través de los vasos sanguíneos son reeducadas para promover el desarrollo de vasos y evitar que ataquen a las células neoplásicas, creando un microambiente inmunosuprimido. Las células inmunes pasan de intentar acabar con el tumor a promover su crecimiento, agravando la agresividad de los GBM. En esta inmunosupresión parecen intervenir, entre otros, Tregs y TAMs induciendo tolerancia o desregulando puntos de control [42].

Mediante qRT-PCR, en relación con este microambiente inmunosuprimido, se analizaron los niveles de expresión de diferentes biomarcadores relacionados con las células del sistema inmunitario, cuyos resultados se recogen en la **Figura 5**. En primer lugar, se estudiaron los genes biomarcadores de macrófagos/microglía (TAMs) *Cd11b*, *F4/80*, *Mrc1*, *Pik3cg* y *Cd163*. La tendencia en la disminución en la expresión génica de *Cd163* sugiere que la silibinina puede disminuir la respuesta inmunosupresora en los GBM, y aunque esta diferencia no llegó a tener suficiente grado de significación, quizá con una muestra más grande realizando más ensayos podría llegar a ser significativa. No hubo cambios reseñables en el resto de los marcadores de macrófagos/microglía. Asimismo, se analizó la expresión de *Cd3*, *Cd4* y *Cd8* como biomarcadores de linfocitos T, y se detectó un aumento significativo de la expresión génica de estos biomarcadores en los ratones tratados con silibinina respecto al control, lo que sugiere

que la silibinina puede mejorar la respuesta inmunitaria en los GBMs, contraponiéndose al efecto inmunosupresor. Este resultado sugiere que parece haber una mayor presencia de linfocitos T CD3+ en los GBM tratados con silibinina, y esta mayor tasa de infiltración de linfocitos en el área del tumor puede ser un pronóstico favorable. Este hallazgo es relevante porque los GBM presentan un microentorno altamente inmunosupresor, que inhibe la infiltración y activación de los linfocitos T; entonces una mayor infiltración linfocitaria se podría relacionar con una respuesta inmune más activa en los pacientes tratados farmacológicamente, ya que el aumento de la infiltración de los linfocitos T activados, esenciales en el reconocimiento y eliminación de las células cancerosas, se asocia a una mejora de las tasas de supervivencia de los pacientes. Por tanto, se podría afirmar que la silibinina podría tener una actividad terapéutica asociada a la activación de la respuesta inmune y a la capacidad de potenciar la proliferación y la infiltración de linfocitos T, pudiendo ser eficaz en el tratamiento del GBM.

Marcadores inmune

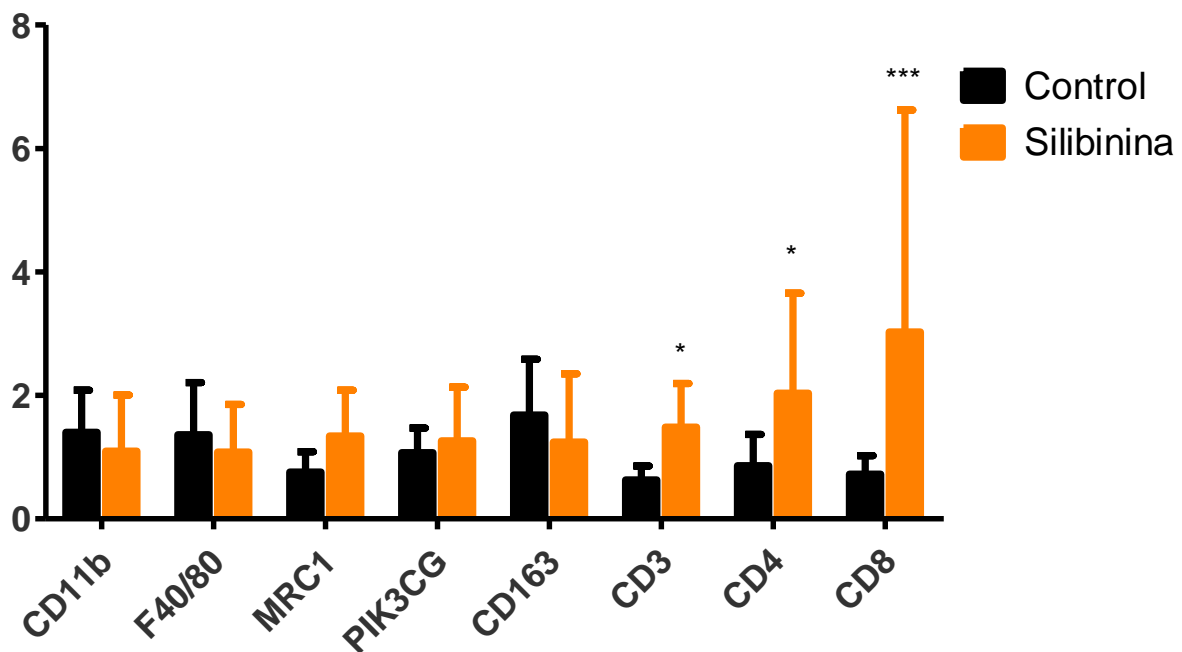


Figura 5. Análisis mediante qRT-PCR de los niveles de expresión de marcadores del sistema inmunitario. Se utilizó como control de carga *Actina*. En este gráfico de barras se representan los resultados obtenidos con sus desviaciones estándar, con unos niveles de significación * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

ANÁLISIS MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA DE MARCADORES INMUNES EN RESPUESTA A SILIBILINA.

Para confirmar la hipótesis formulada anteriormente de que habría una mayor presencia de linfocitos T CD3⁺ en los GBM tratados con silibinina, los resultados obtenidos fueron complementados con una inmunohistoquímica contra CD3, para poder visualizar en el tejido estos cambios. Como se puede apreciar en la **Figura 6**, se observa una mayor presencia de CD3 en el tejido tumoral de los ratones tratados con silibinina, lo que sugiere una mayor tasa de infiltración de linfocitos hacia el área tumoral para atacarlo.

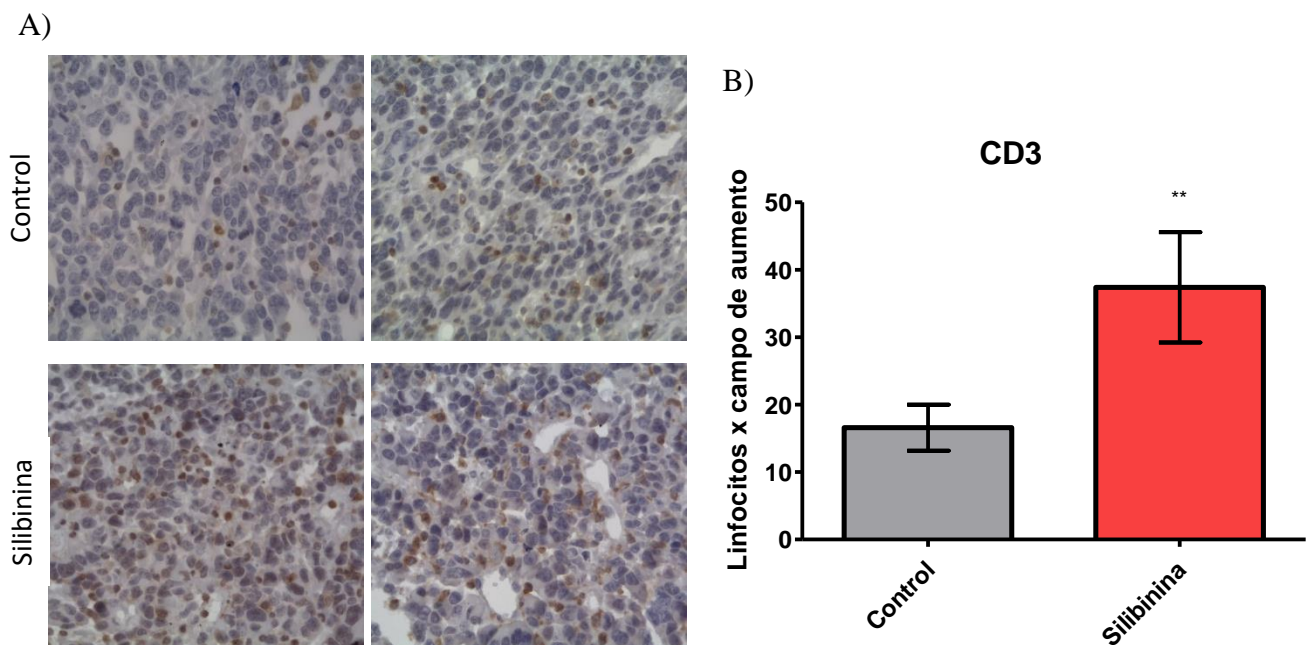


Figura 6. Estudio mediante inmunohistoquímica de la presencia de linfocitos en el tejido tumoral. En A, imágenes representativas de la tinción inmunohistoquímica (IHC) de CD3 (en marrón) y hematoxilina/eosina (núcleos en morado) en secciones tumorales procedentes del cerebro de ratones control (arriba) vs. tratados con silibinina (abajo). En B, cuantificación de linfocitos mediante recuento por campo de aumento, en la cual se puede observar que el aumento de la proliferación es significativo con ****p<0.01**.

Sin embargo, aunque estos resultados son alentadores, se requieren investigaciones adicionales para comprender completamente los mecanismos mediante los cuales la silibinina potencia la proliferación y la infiltración de linfocitos T, así como para evaluar si los hallazgos obtenidos en líneas celulares y modelos de ratón son aplicables a los GBM humanos.

Cabe destacar que, en base a estos hallazgos, podría ser interesante la opción de combinar la silibinina con inmunoterapia en el futuro. Al actuar sobre el sistema inmunitario del paciente, podría verse beneficiado por una sinergia de sus efectos, ya que se reforzaría el funcionamiento del sistema inmunitario, potenciando su activación y búsqueda de células tumorales para atacarlas en un microambiente tan inmunosupresor como es el de los GBMs.

Un ejemplo de inmunoterapia en la que podría ser prometedora la sinergia con silibinina sería en el uso de anticuerpos inhibidores de los puntos de control del sistema inmune (anti-PD1 y anti-PDL1). Esta combinación podría ser beneficiosa porque se sabe que, concretamente en los gliomas se sobreexpresa la proteína PD-L1, lo que tiene efectos devastadores sobre el sistema inmunitario del huésped [43,44]. Esto se debe a que al unirse a su receptor PD-1, presente en las células CD4+ y CD8+, se inhibe la activación de las células T, la proliferación y la producción de citoquinas [45,46]. Asimismo, inhibidores de PD-1 como es el caso de pembrolizumab han tenido éxito en modelos preclínicos, al aumentar las células CD8+ [47,48]. Gracias a su mecanismo de acción, se activan los linfocitos T para que pasen a reconocer y destruir las células tumorales. Otra opción podría ser el tratamiento con células CAR-T. Las células CAR-T están modificadas genéticamente para dirigirse a antígenos asociados a tumor independientemente de los complejos de histocompatibilidad [49,50]. Las CAR-T pueden construirse para dirigirse a cualquier antígeno, específico del tumor o asociado al mismo, y pueden alterarse para distinguir las células tumorales de las no tumorales [50]. Las terapias basadas en células CAR T han demostrado su eficacia en modelos murinos de glioma [51], siendo también interesante probar su sinergia con silibinina como modalidad terapéutica.

CONCLUSIONES

En este proyecto hemos podido observar que la silibinina ejerce sus efectos anticancerígenos en el GBM a través de múltiples mecanismos. Por una parte, en base a los resultados obtenidos, parece que hay una bajada de expresión de los genes mesenquimales como *Snail*, *αSma* y *Taz*, lo que podría asociarse a una menor vascularización del tejido tumoral y una menor rotura de la BHE. Asimismo, con la regulación a la baja de estos, se puede sugerir que la silibinina inhibe el proceso EMT, favoreciendo características epiteliales y reduciendo las mesenquimales.

Por otra parte, es sabido que los GBMs presentan un microentorno altamente inmunosupresor, que inhibe la infiltración y activación de los linfocitos T. Según los resultados de este proyecto, en los ratones tratados con silibinina se ha potenciado la infiltración de linfocitos T, al verse aumentado su recuento en el área tumoral de manera significativa, lo que puede ser eficaz en el tratamiento del glioblastoma.

No obstante, aunque la silibinina podría tener un potencial terapéutico como tratamiento del glioblastoma, más estudios se tendrían que realizar para validar estos resultados en otro modelo y con un mayor número muestral, por lo que es necesario seguir investigando para terminar de comprender plenamente los mecanismos por los que la silibinina aumenta la proliferación y la infiltración de linfocitos T, para evaluar si los hallazgos en modelos de ratón pueden extrapolarse a los glioblastomas humanos. Sería interesante evaluar la opción de combinar silibinina e inmunoterapia con inhibidores anti-PD1 o anti-PDL1 como posible tratamiento en el futuro, ya que como el TME de los GBMs es inmunosupresor podrían sinergizar y verse potenciado su efecto conjunto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mooney, J.; Bernstock, J.; Ilyas, A.; Ibrahim, A.; Yamashita, D.; Markert, J.M.; Nakano, I. Current Approaches and Challenges in the Molecular Therapeutic Targeting of Glioblastoma. *World Neurosurg.* 2019, 129, 90–100.
2. Aldape, K.; Brindle, K.M.; Chesler, L.; Chopra, R.; Gajjar, A.; Gilbert, M.R.; Gottardo, N.G.; Gutmann, D.H.; Hargrave, D.; Holland, E.C.; et al. Challenges to curing primary brain tumours. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2019, 16, 509–520.
3. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016; 131:803–20.
4. Ceccarelli, M., Barthel, F. P., Malta, T. M., Sabedot, T. S., Salama, S. R., Murray, B. A., et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell.* 2016, 164, 550–563. doi: 10.1016/j.cell. 2015.12.028
5. M.L. Wong, A.H. Kaye, C.M. Hovens. Targeting malignant glioma survival signalling to improve clinical outcomes, *J. Clin. Neurosci.* 2007, 14 (4), 301–308.
6. R.K. Balvers, C.M. Dirven, S. Leenstra, M.L. Lamfers, Malignant glioma in vitro models: on the utilization of stem-like cells, *Curr. Cancer Drug Targets.* 2016, 17 (3), 255–266.
7. J. Chen, Y. Li, T.S. Yu, R.M. McKay, D.K. Burns, S.G. Kernie, L.F. Parada, A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature.* 2012, 488 (7412), 522–526.
8. B.D. Liebelt, T. Shingu, X. Zhou, J. Ren, S.A. Shin, J. Hu, Glioma stem cells: signaling, microenvironment, and therapy, *Stem Cells Int.* 2016, 7849890.
9. Schiffer D, Annovazzi L, Casalone C, Corona C, Mellai M. Glioblastoma: Microenvironment and Niche Concept. *Cancers (Basel).* Volume 11, Issue 1, Page: 5. Published 2018 Dec 20.
10. Hardee, M.E.; Zagzag, D. Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. *Am. J. Pathol.* 2012, 181,1126–1141.
11. Thorsson, V.; Gibbs, D.L.; Brown, S.; Wolf, D.; Bortone, D.S.; Yang, T.-H.O.; Porta-Pardo, E.; Gao, G.F.; Plaisier, C.L.; Eddy, J.A.; et al. The Immune Landscape of Cancer. *Immunity* 2018, 48, 812–830.e14.
12. Missiaen, R.; Mazzone, M.; Bergers, G. The reciprocal function and regulation of tumor vessels and immune cells offers new therapeutic opportunities in cancer. *Semin. Cancer Biol.* 2018, 52, 107–116.

13. Verhaak, R.G.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P.; et al. Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* 2010, 17, 98–110.
14. Cheng L, Huang Z, Zhou W, Wu Q, Donnola S, Liu JK, and others. Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell*. 2013. 153(1):139–52.
15. Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, and others. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature*. 2010, 468(7325):824–8.
16. Wang R, Chadalavada K, Wilshire J, Kowalik U, Hovinga KE, Geber A, and others. Glioblastoma stem-like cells give rise to tumour endothelium. *Nature*. 2010, 468 (7325):829-33.
17. Gargini R, Segura-Collar B, Herranz B, Garcia-Escudero V, Romero-Bravo A, Nunez FJ, and others. The IDH-TAU-EGFR triad defines the neovascular landscape of diffuse gliomas. *Sci Transl Med*. 2020, 12(527): eaax1501.
18. Louis DN, Wesseling P, Aldape K, Brat DJ, Capper D, Cree IA, et al. cIMPACT-NOW update 6: new entity and diagnostic principle recommendations of the cIMPACT-Utrecht meeting on future CNS tumor classification and grading. *Brain Pathol*. 2020.
19. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell*. 2013;155(2):462-77.
20. Ou A, Ott M, Fang D, Heimberger AB. The Role and Therapeutic Targeting of JAK/STAT Signaling in Glioblastoma. *Cancers (Basilea)*. 2021;13(3). doi: 10.3390/cancers13030437.
21. R. Stupp, W.P. Mason, M.J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M.J. Taphoorn, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma, *N. Engl. J. Med*. 2005, 352 (10), 987–996.
22. Andrzejewska J, Sadowska K, Mielcarek S. Effect of sowing date and rate on the yield and flavonolignan content of the fruits of milk thistle (*Silybum marianum* L. Gaertn.) grown on light soil in a moderate climate. *Ind Crops Prod*. 2011;33(2):462-468. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2010.10.027>
23. Křen V, Walterova D. Silybin and silymarin—new effects and applications. *Biomed Papers*. 2005;149(1):29-41. <https://doi.org/10.5507/bp.2005.002>
24. Saller R, Meier R, Brignoli R. The use of silymarin in the treatment of liver diseases. *Drugs*. 2001;61(14):2035-2063. <https://doi.org/10.2165/00003495-200161140-00003>

25. Vargas-Mendoza N, Madrigal-Santillán E, Morales-González Á, et al. Hepatoprotective effect of silymarin. *World J Hepatol.* 2014;6(3):144. <https://doi.org/10.4254/wjh.v6.i3.144>
26. Takemoto T, Ikegawa S, Nomoto K. Studies on constituents of *Silybum marianum* (L.) Gaertn. I. New flavonolignans named 2,3-dehydrosilymarin and 2,3-dehydrosilychristin. *AGRIS (FAO of the UN).* 1975; 95(8):1017 PMID: 123760. <https://doi.org/10.1248/yakushi1947>
27. Kim NC, Graf TN, Sparacino CM, Wani MC, Wall ME. Complete isolation, and characterization of silybins and isosilybins from milk thistle (*Silybum marianum*). *Org Biomol Chem.* 2003; 1:1684-1689. <https://doi.org/10.1039/B300099K>
28. Simánek V, Kren V, Ulrichová J, Vicar J, Cvak L. Silymarin: what is in the name...? An appeal for a change of editorial policy. *Hepatology.* 2000;32(2):442-444. <https://doi.org/10.1053/jhep.2000.9770>
29. Biedermann D, Vavříková E, Cvak L, Křen V. Chemistry of silybin. *Nat Prod Rep.* 2014;31(9):1138-1157. <https://doi.org/10.1039/C3NP70122K>
30. Priego N, Zhu L, Monteiro C, Mulders M, Wasilewski D, Bindeman W, et al. STAT3 label a subpopulation of reactive astrocytes required for brain metastasis. *Nat Med.* 2018; 24(7):1024-35. doi: 10.1038/s41591-018-0044-4.
31. Segura-Collar B, Garranzo-Asensio M, Herranz B, Hernández-SanMiguel E, Cejalvo T, Casas BS, et al. Tumor-derived pericytes driven by EGFR mutations govern the vascular and immune microenvironment of gliomas. *Cancer Res.* 2021. doi: 10.1158/0008-5472.can-20-3558.
32. Varghese L, Agarwal C, Tyagi A, Singh RP, Agarwal R. Silibinin efficacy against human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(23):8441–8448. [PubMed: 16322307]
33. Brandon-Warner E, Sugg JA, Schrum LW, McKillop IH. Silibinin inhibits ethanol metabolism and ethanol-dependent cell proliferation in an in vitro model of hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 291(1):120–129. [PubMed: 19900758]
34. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2006; 66(17):8319–8326. [PubMed: 16951136]
35. Liebner S, Dijkhuizen RM, Reiss Y, Plate KH, Agalliu D, Constantin G. Functional morphology of the blood-brain barrier in health and disease. *Acta Neuropathol.* 2018;135(3):311–36.
36. Zhao J, Agarwal R. Tissue distribution of silibinin, the major active constituent of silymarin,

in mice and its association with enhancement of phase ii enzymes: Implications in cancer chemoprevention. *Carcinogenesis*. 1999; 20(11):2101–2108. [PubMed: 10545412]

37. Sharma G, Singh RP, Chan DC, Agarwal R. Silibinin induces growth inhibition and apoptotic cell death in human lung carcinoma cells. *Anticancer Res*. 2003; 23(3B):2649–2655. [PubMed: 12894553]

38. Singh RP, Mallikarjuna GU, Sharma G, Dhanalakshmi S, Tyagi AK, Chan DC, et al. Oral silibinin inhibits lung tumor growth in athymic nude mice and forms a novel chemocombination with doxorubicin targeting nuclear factor kappaB-mediated inducible chemoresistance. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(24):8641–8647. [PubMed: 15623648]

39. Mazziere R., Pucci F., Moi D., Zonari E., Ranghetti A., Berti A., Politi L.S., Gentner B., Brown J.L., Naldini L., et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell*. 2011; 19:512–526. doi: 10.1016/j.ccr.2011.02.005. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

40. Lewis C.E., Ferrara N. Multiple effects of angiopoietin-2 blockade on tumors. *Cancer Cell*. 2011; 19:431–433. doi: 10.1016/j.ccr.2011.03.016. [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

41. Holopainen T., Saharinen P., D’Amico G., Lampinen A., Eklund L., Sormunen R., Anisimov A., Zarkada G., Lohela M., Helotera H., et al. Effects of angiopoietin-2-blocking antibody on endothelial cell-cell junctions and lung metastasis. *J. Natl. Cancer Inst*. 2012; 104:461–475. doi: 10.1093/jnci/djs009. [PMC free article] [PubMed] [CrossRef] [Google Scholar] [Ref list]

42. Woroniecka K, Chongsathidkiet P, Rhodin K, Kemeny H, Dechant C, Farber SH, Elsamadicy AA, Cui X, Koyama S, Jackson C, Hansen LJ, Johanns TM, Sanchez-Perez L, Chandramohan V, Yu YA, Bigner DD, Giles A, Healy P, Dranoff G, Weinhold KJ, Dunn GP, Fecci PE. T-Cell Exhaustion Signatures Vary with Tumor Type and Are Severe in Glioblastoma. *Clin Cancer Res*. Volume 24, Issue 17, Pages: 4175-4186. September 2018.

43. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*. 2006; 13:84-88.

44. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, et al. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J*. 2003. 17:1892-1894.

45. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol.* 2003; 33:2706-2716.
46. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM. Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate antitumor immunity. *Curr Opin Immunol.* 2012; 24:207-212
47. Reardon DA, Gokhale PC, Klein SR, et al. Glioblastoma eradication following immune checkpoint blockade in an orthotopic, immunocompetent model. *Cancer Immunol Res.* 2015;4: 124-135.
48. Zeng J, See AP, Phallen J, et al. Anti-PD-1 blockade and stereotactic radiation produce long-term survival in mice with intracranial gliomas. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2013; 86:343-349
49. Dotti G, Gottschalk S, Savoldo B, Brenner MK. Design and development of therapies using chimeric antigen receptor-expressing T cells. *Immunol Rev.* 2014; 257:107-126.
50. Choi BD, Maus MV, June CH, Sampson JH. Immunotherapy for glioblastoma: adoptive T-cell strategies. *Clin Cancer Res.* 2019; 25:2042-2048
51. Choi BD, Suryadevara CM, Gedeon PC, et al. Intracerebral delivery of a third generation EGFRvIII-specific chimeric antigen receptor is efficacious against human glioma. *J Clin Neurosci.* 2014; 21:189-190

ANEXO A. MATERIAL COMPLEMENTARIO

Tabla A1. Lista de los cebadores utilizados para el análisis mediante qRT-PCR.

<i>Actina</i>	Forward: ACCATCGGCAATGAGCGTTTCC
	Reverse: GCTGTTGTAGGTGGTCTCATGG
<i>Cd31</i>	Forward: CCAAAGCCAGTAGCATCATGGTC
	Reverse: GGATGGTGAAGTTGGCTACAGG
<i>Vegfr2</i>	Forward: CGAGACCATTGAAGTGAAGTGGCC
	Reverse: TTCCTCACCTGCGGATAGTCA
<i>Ang1</i>	Forward: AACCGAGCCTACTCACAGTACG
	Reverse: GCATCCTTCGTGCTGAAATCGG
<i>Ang2</i>	Forward: AACTCGCTCCTTCAGAAGCAGC
	Reverse: TTCCGCACAGTCTCTGAAGGTG
<i>Pdgfrβ</i>	Forward: GTGGTCCTTACCGTCATCTCTC
	Reverse: GTGGAGTCGTAAGGCAACTGCA
<i>Cd248</i>	Forward: TTGATGGCACCTGGACAGAGGA
	Reverse: TCCAGGTGCAATCTCTGAGGCT
<i>αSma</i>	Forward: ACCATCGGCAATGAGCGTTTCC
	Reverse: GCTGTTGTAGGTGGTCTCATGG
<i>Aif</i>	Forward: CCTTTCCTGCTGATTGGTGGAG
	Reverse: GGTCGCATGTATGGCAGTTCAG
<i>Snail</i>	Forward: TGTCTGCACGACCTGTGGAAAG
	Reverse: CTTACATCCGAGTGGGTTTGG
<i>Serpine1</i>	Forward: CCTCTTCCACAAGTCTGATGGC
	Reverse: GCAGTTCCACAACGTCATACTCG
<i>Taz</i>	Forward: CCTTATCACCGTCTCCAACCAC
	Reverse: CCTTGGTGAAGCAGATGTCTGC
<i>Cd44</i>	Forward: CGGAACCACAGCCTCCTTTCAA
	Reverse: TGCCATCCGTTCTGAAACCACG
<i>Cd11b</i>	Forward: GCAGCACTGAGATCCTGTTTA
	Reverse: CTCCACTTGGTCTCTGTCTTAG
<i>F4/80</i>	Forward: CATAATCGCTGCTGGTTGAATAC
	Reverse: GGCAAGGAGGACAGAGTTTAT
<i>Mrc1</i>	Forward: GTTACCTGGAGTGATGGTTCTC
	Reverse: AGGACATGCCAGGGTCACCTTT
<i>Pik3cg</i>	Forward: CTGGAGAGCTTAGAGGACGATG
	Reverse: AAGCCACGCTTCAGCAGGAATC
<i>Cd163</i>	Forward: GGCTAGACGAAGTCATCTGCAC
	Reverse: CTTCGTTGGTCAGCCTCAGAGA
<i>Cd3</i>	Forward: TCTCATTGCGGGACAGGATGGA
	Reverse: CCTTGGAGATGGCTGTACTGGT
<i>Cd4</i>	Forward: GTTCAGGACAGCGACTTCTGGA
	Reverse: GAAGGAGAACTCCGCTGACTCT
<i>Cd8</i>	Forward: GAATGTGAAGCCAGAGGACAGTG
	Reverse: GGGCAGTTGTAGGAAGGACATC

Tabla A2. Lista de anticuerpos utilizados para el marcaje en el Western Blot.

GAPDH	Anticuerpo primario: Santa Cruz sc-47724 (1:1000)
	Anticuerpo secundario: ThermoFisher Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP (Product # G-21040) (1:5000)
α SMA	Anticuerpo primario: Santa Cruz Biotechnology (SC-32251) (1:1000)
	Anticuerpo secundario: ThermoFisher Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP (Product # G-21040) (1:5000)
SNAI1	Anticuerpo primario: Santa Cruz Biotechnology sc-271977 (1:1000)
	Anticuerpo secundario: ThermoFisher Goat anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, HRP (Product # G-21040) (1:5000)
TAZ	Anticuerpo primario: Cell Signaling 8418S (1:1000)
	Anticuerpo secundario: Cell Signaling Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody HRP-conjugated Cat# 7076 (1:5000)
pNF-kB	Anticuerpo primario: Cell Signaling #3033 (1:1000)
	Anticuerpo secundario: Cell Signaling Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody HRP-conjugated Cat# 7076 (1:5000)

Tabla A3. Lista de los anticuerpos utilizados para la tinción de inmunohistoquímica.

CD3	Anticuerpo primario: DAKO (A045229-2) (1:1000)
	Anticuerpo secundario: Cell Signaling Goat anti-Rabbit IgG Secondary Antibody HRP-conjugated Cat# 7076 (1:5000)

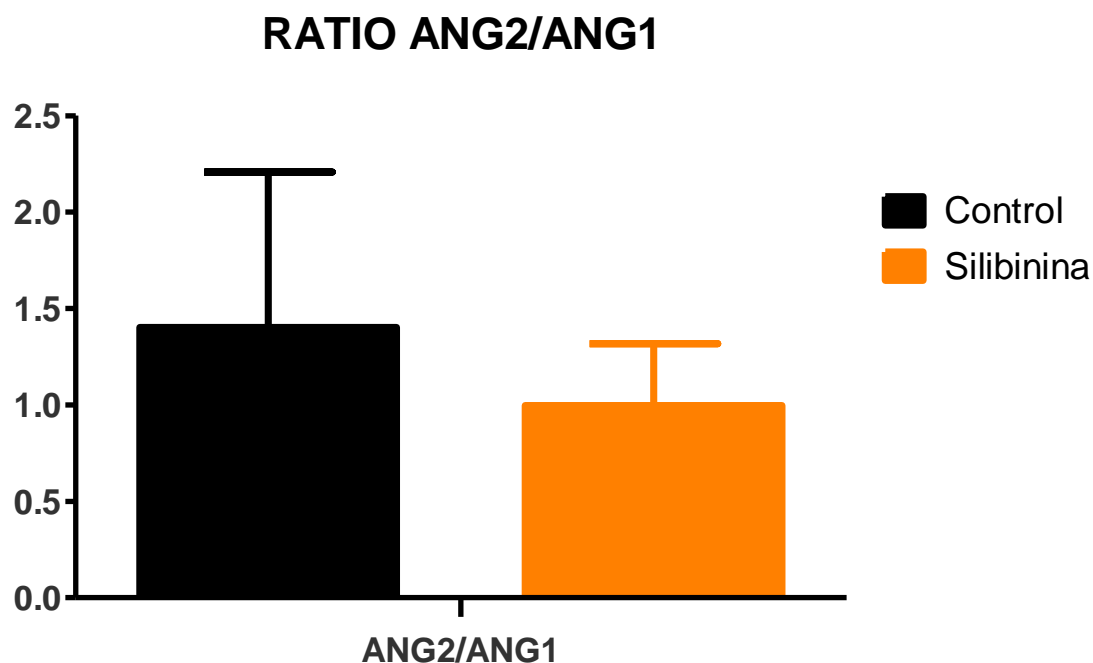


Ilustración A1. Comparación de la ratio de expresión de ang1/ang2 entre las muestras control y las tratadas con silibinina. Se observa una disminución aproximadamente del 30%, pero esta bajada no llega a ser significativa.

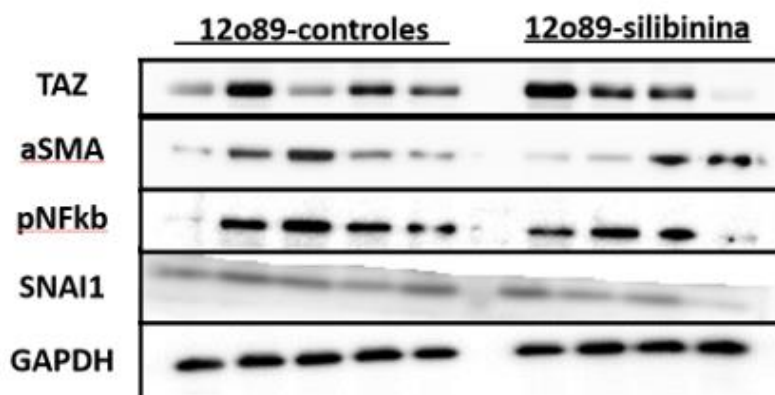


Ilustración A2. Análisis por Western-Blot (WB) de TAZ, α SMA, pNF κ B y SNAI1 en la línea 12o89.

ANEXO B. SOSTENIBILIDAD

Gracias al progreso de la biología sintética, podemos diseñar plantas para mejorar su productividad y hacer mucho más de algo que ya producen mediante ingeniería genética. En este caso, aplicándolo al cultivo de cardo mariano, podríamos obtener mayores cantidades de sus principios activos para poder llevar a cabo una producción mayor sin la necesidad de recurrir a su síntesis química en un laboratorio, al aumentar el rendimiento de extracción mediante la adaptación y refinamiento de la maquinaria que poseen. La gran ventaja de usar plantas es que puede ser mucho menos costoso que producir estas moléculas complejas mediante procesos químicos y más sostenible, ya que no producirían emisiones ni desechos contaminantes, siendo un proceso más respetuoso con el medio ambiente. En el futuro, es probable que existan invernaderos que parezcan fábricas de plantas en las cuales se produzcan moléculas de gran complejidad de una manera más ecológica, barata y sostenible que en la actualidad.