

# UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

## - ANEXOS -

Trabajo Fin de Máster

***“Apoptosis inducida por el inhibidor del proteasoma Ixazomib en células de mieloma humano”***

*“Apoptosis induced by the proteasome inhibitor Ixazomib in human myeloma cells”*



## Anexo I. Comparación de los IC<sub>50</sub> obtenidos en líneas de Mieloma Múltiple para diferentes inhibidores del proteasoma.

**Tabla A1.** Comparación de IC<sub>50</sub> (24 h) obtenidos en diversas líneas de mieloma para diferentes inhibidores del proteasoma. Los valores de IC<sub>50</sub> relacionados con Ixazomib están extraídos del presente TFM. Los IC<sub>50</sub> de Carfilzomib se obtuvieron de la Tesis Doctoral de Jarauta (2015) y los valores relacionados con Bortezomib de Balsas et al., *Biochem. Pharmacol.*, vol. 77, no. 5, pp. 804–812, 2009.

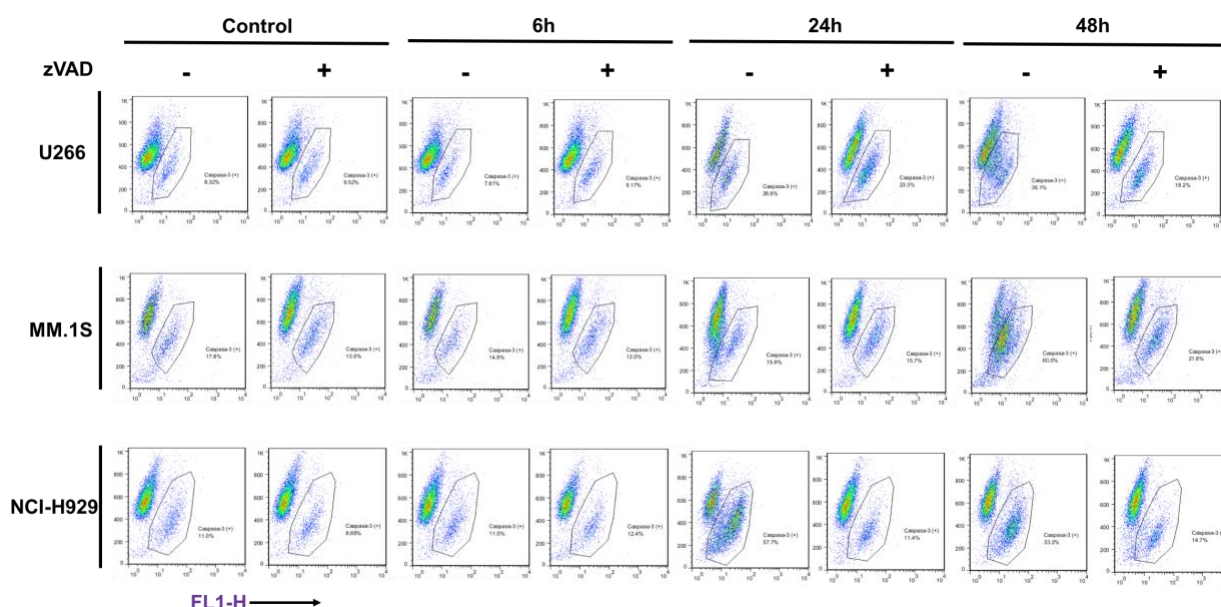
Línea Celular	Carfilzomib (nM)	Bortezomib (nM)	Ixazomib (nM)
U266	5	-	>50
MM.1S	5	5,2	43
NCI-H929	4	4,1	37

## Anexo II. Comparación del porcentaje de células en las diferentes fases del ciclo en presencia o ausencia de Ixazomib

**Tabla A2.** Análisis del efecto de Ixazomib en el ciclo celular. Quedan recogidos los porcentajes medios obtenidos en tres experimentos independientes para cada una de las fases del ciclo celular y en cada una de las líneas de MM estudiadas. El análisis estadístico se realizó entre la situación control y la situación tratada con Ixazomib. Todas las SD obtenidas fueron inferiores al 15%.

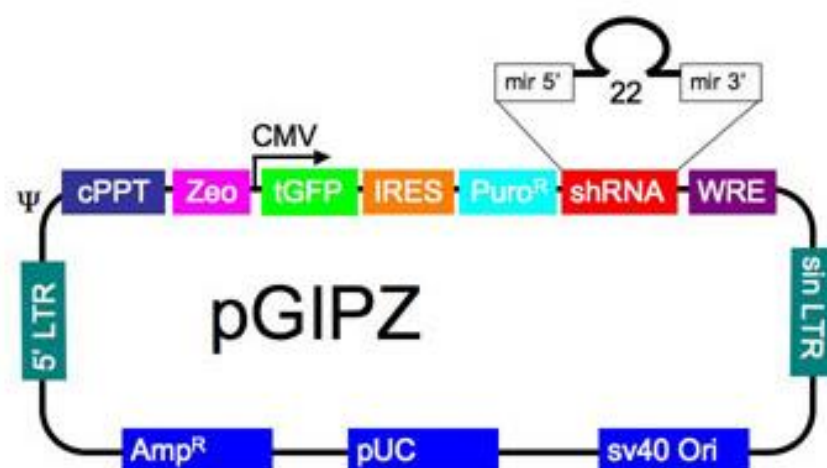
Análisis del efecto de Ixazomib en el Ciclo Celular									
	U266			MM.1S			NCI-H929		
Fases	Control (%)	+Ixaz. (%)	Significancia Estadística	Control (%)	+Ixaz. (%)	Significancia Estadística	Control (%)	+Ixaz. (%)	Significancia Estadística
Apoptóticas	1,1	2,3	-	0,4	1,3	-	1,4	2,5	-
G0/G1	79,3	74,2	-	73,5	63	**	46,1	40,8	-
S	7	4,6	-	6,6	2,6	**	22,3	16	-
G2/M	12,7	19,4	*	18,3	33,1	**	30,2	41,4	**

### Anexo III. Análisis de la influencia de Ixazomib sobre la activación de caspasa 3 en diversas líneas de Mieloma Múltiple



**Figura A2: Análisis de activación de la caspasa 3.** En este caso la línea U266 se incubó con una concentración 50 nM, la línea MM.1S se incubó con una concentración 25 nM y la línea NCI-H929 se incubó con 15 nM. La activación de caspasa 3 se evaluó en ausencia y presencia de zVAD (50  $\mu$ M). Se recogieron muestras a 0, 6, 24 y 48 h para el análisis de la activación de la caspasa 3 mediante citometría de flujo. Se muestran los gráficos tipo dot-plot obtenidos para cada línea y en cada una de las situaciones estudiadas. La región del gráfico encerrada por la línea negra corresponde con células positivas para caspasa 3 activa

### Anexo IV. Esquema gráfico del plásmido pGIPZ empleado para el silenciamiento del gen ATG5 en la línea MM.1S



**Figura A3: Plásmido pGIPZ.** Se empleó la línea celular 293T como células empaquetadoras del virus. El plásmido pGIPZ se utilizó en combinación con otros dos plásmidos: pPAX que contenía las secuencias codificantes de proteínas de la cápside vírica y de la retrotranscriptasa así como el plásmido pMD2.G que contenía las secuencias que codifican para proteínas de la envuelta vírica. Para infectar las células MM.1S se utilizó el método “Spin-infection”. La eficiencia de la infección se comprobó por microscopía de fluorescencia, observando la presencia o ausencia de GFP en las células.