

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 IC₅₀ obtenidos en líneas de Mieloma Múltiple para diferentes inhibidores del proteasoma.

Tabla A1. Comparación de IC₅₀ (24 h) obtenidos en diversas líneas de mieloma para diferentes inhibidores del proteasoma. Los valores de IC₅₀ relacionados con Ixazomib están extraídos del presente TFM. Los IC₅₀ 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									
Fases	U266			MM.1S			NCI-H929		
	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

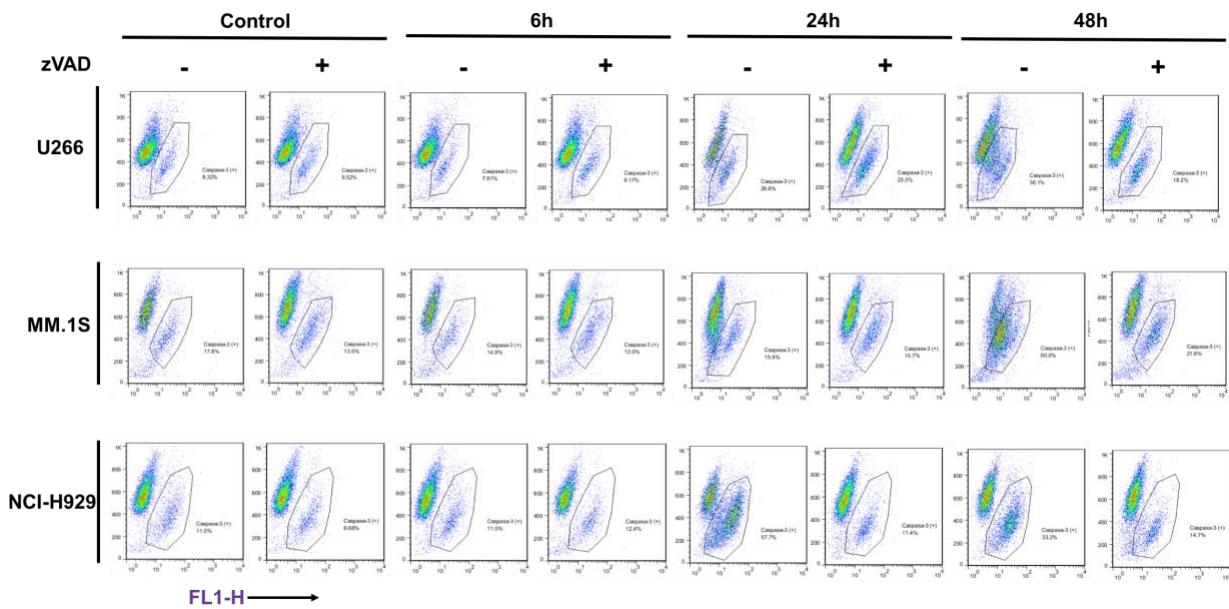


Figura A2: Análisis de activación de la caspase 3. En este caso la línea U266 se incubó con una concentración 50 nM, la línea MM.1S se incubó con una concentración 25 nM y la línea NCI-H929 se incubó con 15 nM. La activación de caspase 3 se evaluó en ausencia y presencia de zVAD (50 μ M). Se recogieron muestras a 0, 6, 24 y 48 h para el análisis de la activación de la caspase 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 caspase 3 activa

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

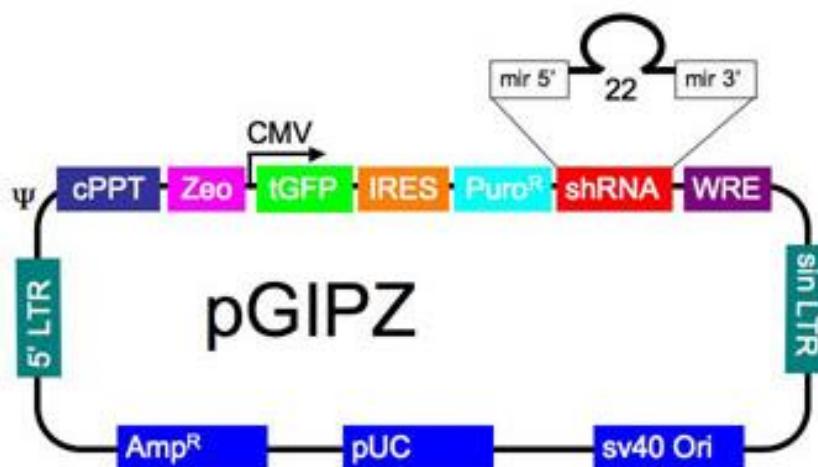


Figura A3: Plásmido pGIPZ. Se empleó la línea celular 293T como células empaquetadoras del virus. El plásmido pGIPZ se utilizó en combinación con otros dos plásmidos: pPAX que contenía las secuencias codificantes de proteínas de la cápside vírica y de la retrotranscriptasa así como el plásmido pMD2.G 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.