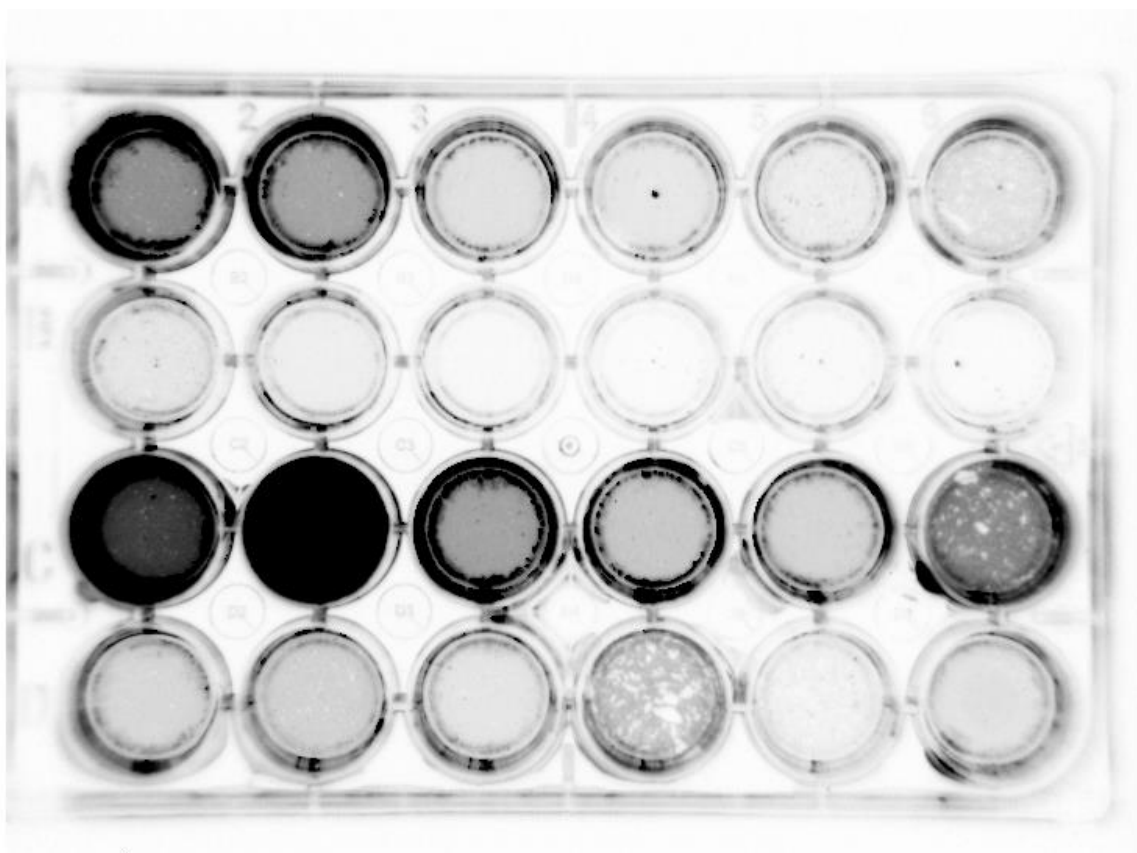




Sección de Biología
Universidad de La Laguna

**Cuantificación de MED12 en células de leiomiomas
uterinos mediante quimioluminiscencia.**

**MED12 quantification in uterine leiomyoma cells using
chemiluminescence.**



Trabajo de Fin de Grado

ANNA LAURA LORUSSO

Tutorizado por María Teresa Acosta Almeida y Lisandra Muñoz Hidalgo
Grado en Biología. Julio 2023

ÍNDICE

Resumen.....	1
Abstract	1
Introducción	2
Leiomiomas uterinos o fibromas.....	2
Predisposición genética.....	3
Mutaciones somáticas involucradas en el desarrollo de los UL.....	4
Mutación de MED12.....	6
Métodos de cuantificación de la expresión génica a nivel de proteína:.....	6
Imagen de células mediante quimioluminiscencia (CLIC).....	7
Silenciamiento de la expresión génica	8
Hipótesis.....	6
Objetivos	6
Material y Métodos.....	11
Descongelación y subcultivo de células en placa.....	11
Fijación, bloqueo y permeabilización de células.....	11
Prueba de diluciones de anticuerpos secundarios.....	12
Prueba de diluciones de anticuerpos primarios Anti-MED12 y Anti-GAPDH.....	13
Prueba de eliminación de anticuerpos primarios	13
Lipofección y eficiencia de transfección.....	14
qPCR para determinar silenciamiento a nivel de ARNm	15
Extracción del ARN.....	15
Retrotranscripción (RT-PCR)	15
PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR).....	15
Análisis de los datos.....	16
CLIC de MED12 para determinar silenciamiento a nivel de proteína	16
Resultados	18
Cultivo celular.....	18
Eficiencia de transfección.....	18
Silenciamiento a nivel de ARNm	19
Silenciamiento a nivel de proteína.....	19
Diluciones de anticuerpos secundarios	19
Diluciones de anticuerpos primarios	20
Eliminación de anticuerpos primarios	20
Cuantificación de proteínas	21

Discusión	23
Conclusiones:.....	26
Conclusions:.....	26
Bibliografía.....	27

Resumen

Los leiomiomas uterinos son uno de los tumores de útero más comunes en mujeres de edad reproductiva, siendo provocados en el 71% de los casos por mutaciones del gen *MED12*, implicado en la codificación de una proteína del complejo Mediador. Se hace necesario estudiar como el silenciamiento de este gen a nivel de ARNm puede inducir el silenciamiento de la proteína y así disminuir sus niveles en cultivos celulares 2D. Al tratarse de cantidades muy pequeñas y cuyas variaciones son mínimas se precisa de un método cuantitativo exacto y fiable. Para la cuantificación de proteínas el método más empleado hoy en día en los laboratorios de cultivos celulares es el Western Blot, el cual presenta una serie compleja de pasos interdependientes cuyas variaciones en el diseño experimental, la metodología y la experiencia del usuario pueden conducir con frecuencia a errores. El objetivo del presente trabajo es poner a punto un inmunoensayo más sencillo, replicable y barato, basado en la obtención de imágenes con quimioluminiscencia en células (CLIC, de las siglas en inglés chemiluminescence imaging of cells) para la cuantificación de la proteína MED12. El silenciamiento de *MED12* podría ser clave para los futuros tratamientos de los miomas uterinos.

Palabras claves: cultivo celular, mutación, silenciamiento, lipofección, GapmeRs.

Abstract

Uterine leiomyomas are one of the most common uterine tumors in women of reproductive age, with 71% of cases being caused by mutations in the *MED12* gene, which is involved in the encoding of a protein in the Mediator complex. It is necessary to study how silencing this gene at the mRNA level can induce protein silencing and thus decrease its levels in 2D cell cultures. Since we are dealing with very small quantities and minimal variations, an exact and reliable quantitative method is required. The most commonly used method for protein quantification in cell culture laboratories today is Western Blot, which involves a complex series of interdependent steps that can often lead to errors due to variations in experimental design, methodology, and user experience. The objective of this work is to develop a simpler, replicable, and cost-effective immunoassay based on chemiluminescence imaging of cells (CLIC) for the quantification of the *MED12* protein. Silencing *MED12* could be crucial for future treatments of uterine leiomyomas.

Keywords: cell culture, mutation, silencing, lipofection, GapmeRs.

Introducción

Introducción

Leiomiomas uterinos o fibromas

Uno de los tumores más recurrentes en mujeres de todo el mundo es el leiomioma uterino (UL), también conocido como fibroma, fibroide o mioma. Se trata de un tumor benigno del músculo liso del útero, que suele aparecer en mujeres de edad fértil, cuya probabilidad incrementa con la edad y tiene regresión con la menopausia al depender de los niveles de hormonas sexuales (Mäkinen *et al.*, 2011). Aproximadamente la mitad de los casos presentan síntomas como dolor abdominal, sangrado anormal e incluso alta probabilidad de infertilidad (Mäkinen *et al.*, 2011), siendo la causa más frecuente de histerectomía, principalmente debido a hiperpolimenorrea o menorragias. El tamaño suele ser variable, encontrando miomas de pocos milímetros, así como otros muy grandes, llegando a ocupar toda la cavidad abdominal.

Los miomas se pueden clasificar según la localización en el útero, y por lo tanto se pueden desarrollar (Corrales *et al.*, 2015):

- Dentro de la pared uterina, expandiéndose y haciendo que el útero sea mucho más grande (intramural). Es la mayor causa de miomatosis.
- Hacia la capa externa (serosa), pudiendo alcanzar otros órganos (subserosos).
- Hacia la cavidad uterina, produciendo grandes desprendimientos del endometrio durante la menstruación (submucoso). En general, suelen ser los causantes de infertilidad y aborto espontáneo en caso de embarazo.
- Entre las divisiones del ligamento ancho que conectan los lados del útero a las paredes laterales de la pelvis (intra-ligamentario, variedad subseroso y en el cuello uterino). Suelen ser poco frecuentes.

Hasta el momento, la etiología de estos miomas todavía no queda clara, aunque se han propuesto varias hipótesis, como la respuesta a lesiones sufridas en el útero como las causadas por isquemia (falta de suministro de sangre), asociada al incremento de sustancias vasoconstrictoras principalmente en mujeres con dismenorrea (Flake *et al.*, 2003). Las células musculares lisas del miometrio reaccionen a la isquemia de manera similar a las células del músculo liso vascular, pasando a tener un fenotipo más proliferativo que contráctil. Además, al igual que ocurre en las lesiones de los vasos sanguíneos, en los miomas incrementa también la expresión del factor del crecimiento de fibroblastos, favoreciendo la proliferación tumoral

por la liberación de mitógenos de células muertas (Lindner & Reidy, 1991; Mangrulkar *et al.*, 1995).

Otra propuesta para la formación de los miomas mantiene que el aumento fisiológico de los niveles de hormonas ováricas (estrógeno y progesterona) durante la fase lútea del ciclo ovulatorio o durante el embarazo para la expansión del miometrio favorece la aparición y el crecimiento del fibroide (Rein, 2000; Richards y Tiltman, 1996; Marshall *et al.*, 1997). Estos cambios hormonales hacen que las células madre sean vulnerables al desarrollo de mutaciones puntuales, como la que afecta a la función de *MED12* y que puede ser el evento iniciador de la tumorigénesis. Las células musculares lisas maduras expresan receptores de estrógeno α ($ER\alpha$) y receptores de progesterona (PR) en niveles más altos que las células madre. Estos receptores median la proliferación celular dependiente de estrógeno y progesterona. Los factores liberados por las células maduras actúan sobre las células madre para inducir su autorrenovación y proliferación. Una mutación en *MED12* o un reordenamiento cromosómico puede transformar una célula madre miometrial en una célula madre fibroide, que se divide de manera descontrolada y se diferencia en una célula de músculo liso de fibroma. Los $ER\alpha$ y los PR se concentran en las células maduras de los fibromas y transmiten señales estrogénicas o progestágenas a través de mecanismos paracrinos. La célula madre fibroide transformada da lugar a un tumor fibroide benigno (Bulun, 2013).

Predisposición genética

Varias evidencias apoyan la idea de una base genética que predispone al desarrollo de miomas, incluyendo:

- La raza, las mujeres afroamericanas presentan una prevalencia mayor, los miomas aparecen a edades más tempranas y los síntomas suelen ser más severos en comparación con las mujeres de raza blanca, llegando a duplicar la probabilidad de padecer la enfermedad (Mäkinen *et al.*, 2011).
- Mayor tasa de concordancia entre gemelos monocigóticos que dicigóticos, al compartir el mismo material genético (Flake *et al.*, 2003).
- Agregación familiar, siendo más probable desarrollar miomas si pacientes de primer grado, como madre o hermanas, presentan UL (33,2% vs 17,6%) (Schwartz *et al.*, 2000).
- Asociación entre el síndrome hereditario de Reed (Fisher & Helwig, 1963; Reed *et al.*, 1973; Thyresson & Su, 1981), donde hay inactivación bialélica del gen de la fumarato hidratasa (FH), que parece actuar como un supresor tumoral. Las

pacientes con este síndrome desarrollan leiomiomas cutáneos y uterinos, leiomiosarcomas uterinos y cáncer de células papilares renales, por lo que la pérdida de este gen predispone al desarrollo de UL.

Mutaciones somáticas involucradas en el desarrollo de los UL

Varios estudios, utilizando técnicas de secuenciación masiva, han podido detectar la relación entre UL y la mutación en el gen que codifica la subunidad 12 del complejo Mediador (*MED12*). Este gen se localiza en el brazo largo del cromosoma X y codifica una de las 30 subunidades del complejo proteico de preiniciación de 1,2 MDa, llamado Mediador (Figura 1). En el 67-70% de los miomas el exón 2 de *MED12* estaba mutado, lo que permitió establecer una relación causal entre la mutación en este gen con la presencia de estos tumores (Mäkinen *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2017). Además, todas las mutaciones se detectaron en el alelo activo de *MED12*. Estudios posteriores en diferentes poblaciones han confirmado estos hallazgos (González *et al.*, 2022; He *et al.*, 2021).

Debido a que el complejo Mediador interactúa con más de 3000 factores de transcripción (TF), controla la transcripción de una amplia gama de genes de una manera conservada evolutivamente. El complejo Mediador se ensambla en cuatro módulos distintos, denominados "cabeza", "medio", "cola" y "quinasa". Mientras que el módulo cabeza, medio y cola forman un complejo denominado núcleo del Mediador, el módulo quinasa se asocia de manera reversible con este núcleo del Mediador. Los módulos cabeza y medio son esenciales para la regulación de la transcripción, mientras que los módulos de la cola y quinasa-CDK desempeñan funciones reguladoras (Figura 1). Los TF específicos de genes generalmente se unen al Mediador a través de su dominio de cola y quinasa, luego transducen señal a través del módulo medio y termina en la cabeza donde interacciona con la ARN Polimerasa II a través de los TF generales (Figura 1). Por lo tanto, todos los módulos del complejo Mediador están involucrados en la regulación transcripcional específica de genes y la arquitectura del Mediador permite la activación de genes situados a gran distancia de las secuencias reguladoras (Zhang *et al.*, 2020).

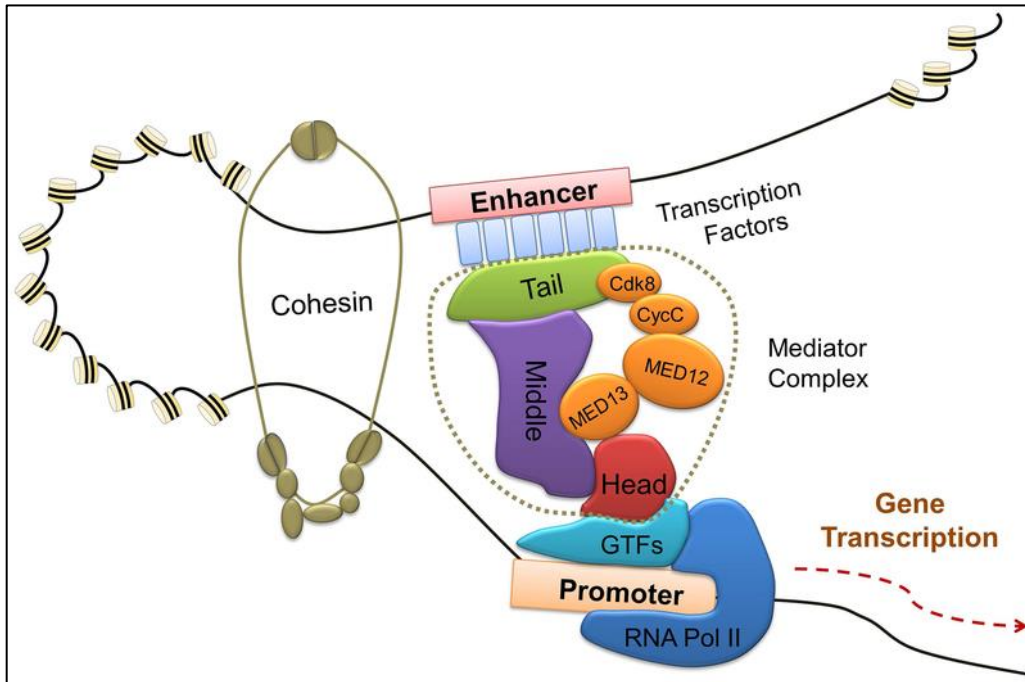


Figura 1. Estructura del complejo Mediador y su interacción con elementos del promotor núcleo y elementos distales como los potenciadores de la transcripción. Tomada de Zhang et al., 2020.

MED12, junto con MED13, Cyclin C (CycC) y CDK8 o CDK19, comprenden el módulo quinasa. MED12 estimula la actividad quinasa de CDK8 al actuar como puente entre MED13 y el complejo CycC-CDK8 (Figura 1). La actividad quinasa de CDK8 con MED12 puede tener los siguientes efectos:

1. CDK8 puede fosforilar factores de transcripción específicos, lo que puede tener un impacto en su actividad transcripcional. La fosforilación de estos factores puede modular su capacidad para unirse al ADN y regular la expresión de genes específicos.
2. La actividad quinasa de CDK8 puede regular la actividad transcripcional a través de la fosforilación de componentes del complejo Mediador. Esto puede afectar la interacción entre el complejo Mediador, los TF y la ARN polimerasa II, influyendo en la iniciación y la elongación de la transcripción.
3. La actividad quinasa de CDK8 puede fosforilar proteínas involucradas en la regulación de vías de señalización intracelulares modulando la respuesta celular a señales externas y contribuyendo a la transcripción diferencial de genes involucrados en estas vías.

Por lo tanto, la actividad quinasa de CDK8, en combinación con MED12 y otros componentes del complejo Mediador, participa en el control de la expresión génica a través de

la regulación de la transcripción. Esto incluye tanto la activación como la represión de genes específicos en respuesta a señales celulares y condiciones ambientales.

Mutación de MED12

Debido a que *MED12* regula procesos fisiológicos esenciales como el desarrollo y la determinación del destino celular, la desregulación de *MED12* a menudo se relaciona con cánceres humanos.

En los últimos años, la incidencia de mutaciones somáticas heterocigóticas de cambio de sentido en *MED12* en tumores humanos ha ido en continuo crecimiento. Las mutaciones de *MED12* ocurren con una frecuencia alta (59-80%) en tumores benignos dependientes de estrógenos, incluidos leiomiomas uterinos, fibroadenomas y tumores filoides de mama (Zhang *et al.*, 2020). Estas mutaciones se agrupan en residuos de aminoácidos altamente conservados (L36, Q43 y G44) siendo la más frecuente la que afecta al codón 44 del exón 2. Estas mutaciones alteran sustancialmente la unión de MED12 con la CycC y por tanto la activación de CDK8, lo que lleva a cambios globales en la expresión génica que, a su vez, deriva en el aumento de la proliferación celular y, por ende, en la formación de tumores. Además, una mutación de *MED12* asociada al leiomioma uterino, MED12 c.131G>A, se ha considerado como una mutación de ganancia de función, que causa inestabilidad genómica e impulsa la formación de tumores (Mittal *et al.*, 2015).

Métodos de cuantificación de la expresión génica a nivel de proteína:

La elección de un método experimental rápido, sensible y objetivo para cuantificar las proteínas presentes en la célula es un paso clave para poder sacar conclusiones fiables de los resultados. El método estándar más ampliamente utilizado para cuantificar proteínas es el Western Blot, conocido como inmunotransferencia o transferencia de proteínas. Para llevar a cabo este procedimiento, primero se separan las proteínas aisladas mediante una electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida, que separa las proteínas según su tamaño y carga eléctrica. Luego, las proteínas separadas se transfieren del gel a una membrana, donde se pueden unir a un anticuerpo primario específico de la proteína de interés. Finalmente, para la detección y análisis de la señal generalmente se usan anticuerpos secundarios específicos del anticuerpo primario conjugados con una enzima como la peroxidasa de rábano picante (HRP) capaz de generar luz tras reaccionar con un sustrato quimioluminiscente (ECL) (Hnasko & Hnasko, 2015).

Pese a que el Western Blot es una técnica versátil y ampliamente utilizada para cuantificar proteínas, posee numerosos inconvenientes incluyendo: 1) necesita varios pasos previo (Pillai-Kastoori *et al.*, 2020) como lisar la célula, liberando proteasas y fosfatasas peligrosas para la integridad de la proteína de interés y que, por lo tanto, requiere la adición de inhibidores y la manipulación de la muestra en frío (Jensen, 2012); 2) la sensibilidad y especificidad del Western Blot pueden variar dependiendo de los anticuerpos utilizados y de las condiciones de la técnica. La detección de proteínas de baja abundancia puede ser desafiante y puede requerir métodos de amplificación de señal; 3) la interpretación de los resultados del Western Blot puede ser subjetiva. La detección y cuantificación de bandas de proteínas requiere experiencia y habilidades en la interpretación de bandas, evitando errores de sobreexposición o subexposición (Mahmood & Yang, 2012); 4) la cuantificación precisa de las proteínas detectadas en el Western Blot puede ser desafiante. La intensidad de las bandas puede no ser directamente proporcional a la concentración de proteína, lo que dificulta la obtención de datos cuantitativos precisos.

Imagen de células mediante quimioluminiscencia (CLIC)

Por todo ello, se hace necesario utilizar métodos alternativos capaces de cuantificar las proteínas de manera sencilla, fiable y reproducible. En este trabajo hemos puesto a punto el método de imagen de células mediante quimioluminiscencia (CLIC). El método de CLIC es capaz de cuantificar las proteínas presentes en células en cultivo de manera sencilla y similar a otros métodos como la microscopía de inmunofluorescencia y el Western Blot (Fisher *et al.*, 2020).

En general, la técnica CLIC (Figura 2) consiste en fijar las células en una placa de cultivo y tras permeabilizar y bloquear uniones inespecíficas se añade un anticuerpo primario específico de la proteína de interés, el cual se unirá a un anticuerpo secundario conjugado con HRP. La adición de ECL genera una señal quimioluminiscente que se detecta mediante un sistema de fotodocumentación de geles. La intensidad de la señal será directamente proporcional a la cantidad de proteína presente en la célula (Figura 2).

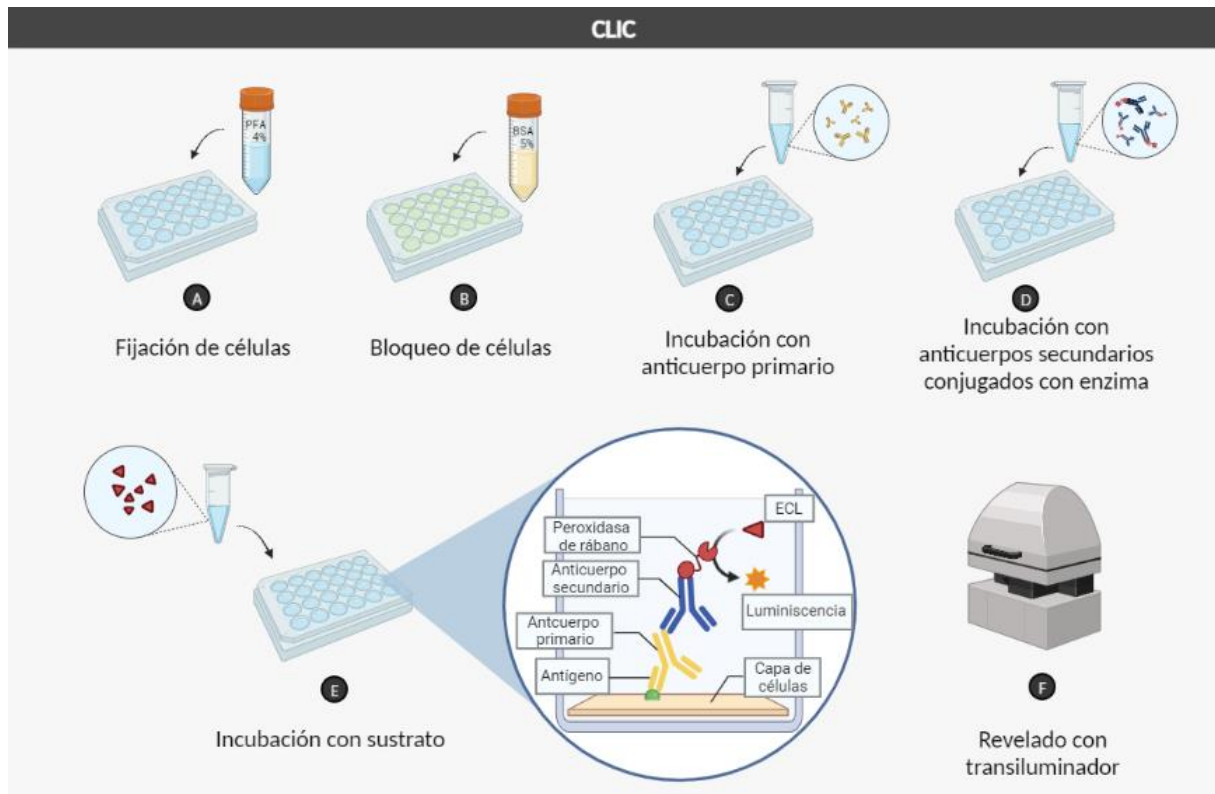


Figura 2. Pasos a seguir para la realización del método CLIC (imagen propia creada con Biorender).

Además, para el análisis cuantitativo se requiere de una o más proteínas de referencia cuya expresión sea estable en todas las muestras analizadas, para usar como control interno para normalizar los resultados (Cañas *et al.*, 2016). Una proteína que se suele utilizar para normalizar los niveles de expresión, que se expresa en niveles altos y de manera constitutiva es la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, GAPDH, que cataliza la fosforilación oxidativa de gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bisfosfoglicerato durante la glucólisis (Zainuddin *et al.*, 2010).

Silenciamiento de la expresión génica

Un método ampliamente utilizado para silenciar la expresión génica consiste en añadir a las células en cultivo oligonucleótidos antisentido monocatenarios o ASOs (Antisense Oligonucleotides) siendo una variante de estos los GapmeRs. Estas moléculas son secuencias de desoxirribonucleótidos de aproximadamente 16 pb de longitud, complementarios al ARNm diana y se encuentran formados por LNAs (locked nucleic acid), una clase de ARN que presentan un puente adicional de metileno. Este enlace conecta el átomo de oxígeno en el C-2' de la ribosa con el átomo C-4', fijando el anillo de ribosa en conformación cerrada (locked), aumentando la resistencia frente la degradación de nucleasas, y favoreciendo el empleo de concentraciones menores de este (Braasch & Corey, 2001). También aumenta la afinidad con el sustrato, al tener un esqueleto de fosforotionato (DeVos & Miller, 2013). La

región central de mayor longitud o “gap” no presenta las modificaciones de los azúcares (Figura 3) para que pueda ser reconocida por la RNasa H. La RNasa H es una endonucleasa ubicua, capaz de reconocer la unión entre ADN y ARNm e hidrolizar la cadena de ARNm unida al GapmeR. Suele ser bastante eficiente, llegando a romper el 80-95% de las moléculas (Dias & Stein, 2002).

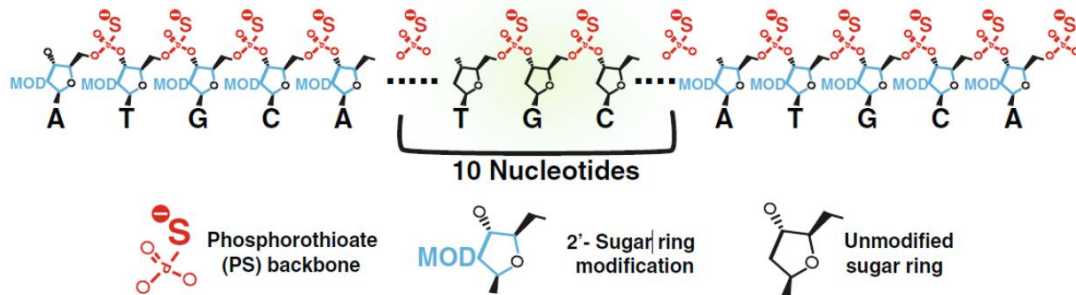


Figura 3. Ejemplo de la estructura de un ASO tipo GapmeR (Tomada de DeVos & Miller, 2013).

Para introducir el GapmeR en el interior de la célula generalmente se usa la lipofección que consiste en el empleo de lípidos para la formación de liposomas catiónicos que encapsulan los GapmeRs y son endocitados al interior celular. Una vez dentro de la célula, se produce el escape del endosoma, liberando el GapmeR en el citoplasma.

El silenciamiento del ARNm de *MED12* conlleva una disminución de su traducción que podría detectarse mediante CLIC.

Objetivos e hipótesis

Hipótesis

La lipofección con GapmeRs específicos dirigidos frente a ARNm del gen *MED12* en células en cultivo induce una disminución tanto del transcrito como de la proteína, lo que se puede cuantificar mediante PCR a tiempo real (qPCR) y el método de CLIC respectivamente.

Objetivos

En función de esta hipótesis, el objetivo general del presente trabajo consiste en cuantificar la disminución de la proteína MED12 tras silenciar su transcrito. Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Silenciar la expresión del gen *MED12* mediante lipofección con GapmeRs específicos en células en cultivo primario de miometrio tras diferentes tiempos de incubación.
- Determinar el silenciamiento de ARNm del gen *MED12* mediante qPCR tras la lipofección.
- Cuantificar la expresión de la proteína MED12 en células en cultivo tras la lipofección mediante el método de CLIC.

Material y métodos

Material y Métodos

Descongelación y subcultivo de células en placa

Las células que se utilizaron para trabajar provenían de cultivos primarios de miometrio, previamente congeladas en N₂ líquido. A la hora de realizar los cultivos 2D se ha procedido a la descongelación de las células. Para ello, se sacó de N₂ líquido una alícuota de 1 ml de las células congeladas e inmediatamente se incubó a 37°C hasta su completa descongelación. A continuación, se añadió gota a gota a un tubo de 15 ml, conteniendo 10 ml de medio de DMEM conteniendo 10% de suero bovino y antibióticos (1% penicilina y 1% estreptomycin), denominado medio completo (Sigma-Aldrich). La muestra se centrifugó 5 minutos a 250 x g y se eliminó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de medio completo y se añadió a una placa de cultivo de 100 mm con el mismo medio (volumen final de 10 ml). Las células, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂, cambiando el medio cada 3 días. Las células usadas en este trabajo se encontraban entre el pase 1 y 5.

Tras comprobar que las células habían crecido adecuadamente y alcanzaban una alta confluencia, se eliminó el medio y se lavó con PBS 1X (*Phosphate-Buffer saline*) y se incubó durante 5-10 minutos con 1 ml de tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich) para levantar las células de la placa. Se añadieron 2 ml de medio completo para bloquear la tripsina y se pasó toda la muestra a un tubo de 15 ml que se centrifugó durante 5 minutos a 250 x g. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento celular en 1 ml de medio completo. Para el conteo de las células viables, a 10 µl de células se añadieron 10 µl del colorante Tryplan Blue y las células se analizaron al microscopio usando la cámara Neubauer o hemocitómero. Para la realización del CLIC y que las células estuvieran en torno al 60-80% de confluencia, se añadieron a cada pocillo 18.500-22.500 células en placas de 24 pocillos y un volumen final de medio completo de 500 µl. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ hasta el momento de comenzar los experimentos.

Fijación, bloqueo y permeabilización de células

Para fijar las células, a cada pocillo se eliminó el medio de cultivo y se añadieron 500 µl de paraformaldehído al 4% (PanReac AppliChem) y se mantuvieron 45 min en agitación a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con 500 µl de TBS 1X (*Tris-Buffer Saline*) durante 8 minutos en agitación a TA. Para bloquear las uniones inespecíficas del anticuerpo, las células se incubaron con 500 µl de TBS 1X conteniendo 5% de albúmina de suero bovino (Corning), 5% de suero bovino (Gibco™ *Goat Serum*) y 0,1%

de Tritón-X100 (Sigma-Aldrich) durante 1 hora en agitación a TA. Finalmente, las células se lavaron con 500 µl de TBS 1X durante 3 minutos por 4 veces, en agitador y TA.

Prueba de diluciones de anticuerpos secundarios

Para la correcta elaboración del método CLIC se necesitó optimizar las diluciones de los anticuerpos a emplear, tanto primarios como secundarios. Es importante determinar la dilución óptima puesto que cantidades insuficientes podrían no ser útiles para la detección de la señal, mientras que cantidades elevadas podrían conllevar uniones inespecíficas y falsear los resultados. Para ello, se preparó una placa de 24 fijando, bloqueando y permeabilizando las células y se probaron las diluciones 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000 y 1:60.000 para el anticuerpo de cabra anti-conejo (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit IgG JAC-115-035-114) con tres réplicas de cada y las diluciones 1:5.000, 1:10.000, 1:20.000, 1:40.000, 1:60.000 y 1:70.000 del anticuerpo de cabra anti-ratón (Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG JAC-115-035-003) con dos réplicas de cada. Las diluciones se dispusieron en los pocillos, así como muestra la Figura 4. Para el revelado, tras 3 horas de incubación con las distintas concentraciones y tipos de anticuerpos secundarios conjugados con HRP (peroxidasa de rábano picante), en agitador, se pasó a lavar 4 veces con TBS 1X durante 3 minutos y se incubó con 250 µl de sustrato quimioluminiscente ECL (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate; Pierce) durante 4 minutos.

La placa se analizó con el sistema ChemiDoc™ XRS⁺ (Bio-rad) y las imágenes se tomaron empleando la aplicación “Chemi” *Hi Resolution* y marcando la opción *Image Exposure, Signal Accumulation*, tomando 15 imágenes durante un total de 300 segundos (una imagen cada 20 segundos).

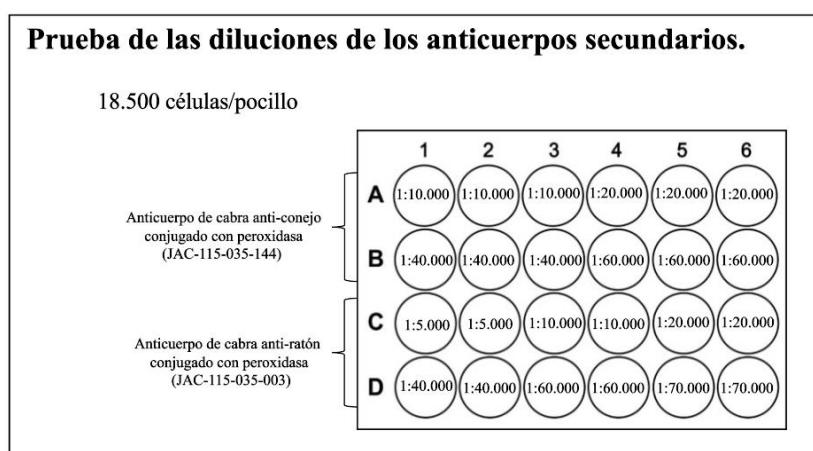


Figura 4. Disposición de las diluciones de los anticuerpos de cabra anti-conejo y de cabra anti-ratón en placa de 24 pocillos.

Prueba de diluciones de anticuerpos primarios Anti-MED12 y Anti-GAPDH

También se quisieron optimizar las concentraciones de anticuerpos primarios anti-MED12 y anti-GAPDH. Tras la preparación de una placa de 24 se quisieron probar tres diluciones del anticuerpo primario Abcam 70842 anti-MED12 (1:250, 1:500 y 1:750) y dos diluciones del anticuerpo primario Mab5718-R&D Systems anti-GAPDH (1:50 y 1:100). En cada pocillo se añadieron 175 μ l de TBS 1X con la correspondiente dilución del anticuerpo y se incubaron durante toda la noche en agitación a 4°C.

Al día siguiente, se lavó 4 veces durante 3 minutos por cada lavado con TBS 1X en agitador a TA y se incubó durante 3 horas con 250 μ l por pocillo de una dilución 1:20.000 (optimizada mediante el anterior ensayo) de los correspondientes anticuerpos secundarios. La placa se mantuvo en agitación durante la incubación. Posteriormente se añadió el sustrato quimioluminiscente y se obtuvo la señal tal y como se describió en el apartado anterior.

Prueba de eliminación de anticuerpos primarios

Para normalizar la señal obtenida de la proteína de interés, MED12, se quiso cuantificar esta proteína y la de expresión constitutiva (GAPDH), en las mismas células, tal y como propone Fisher *et al.*, 2020. Ello evitaría variaciones entre pocillos en cuanto al número de células. Para ello, se realizó una prueba de eliminación del anticuerpo primario anti-MED12 (*stripping*) para posteriormente detectar GAPDH en las mismas células.

Tras el revelado para la cuantificación de la proteína MED12 se lavaron los pocillos 4 veces con 500 μ l de TBS 1X durante 3 minutos y se incubó con 200 μ l de la solución Reblot strong (Merck) dos veces por 20 minutos en agitador a TA. Para confirmar la eliminación de anticuerpos primarios, se añadió el sustrato y se capturaron 15 imágenes durante 300 segundos de exposición.

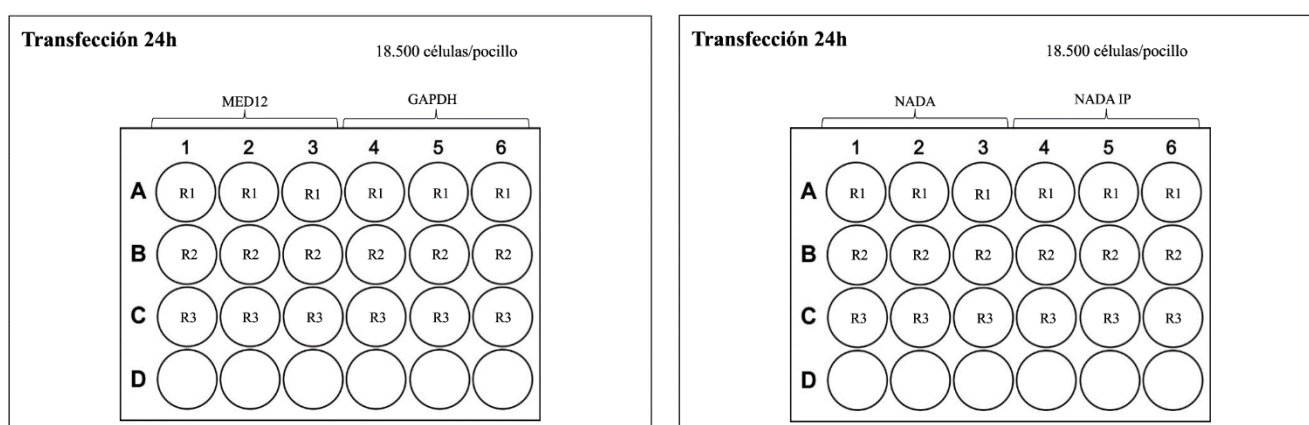
Al obtener señal tras el ensayo, se intentó repetir el experimento variando los tiempos y temperaturas de incubación:

- Dos incubaciones a 37° durante 30 minutos. Para eso se lavaron los pocillos 4 veces por 3 minutos en agitación, se incubó dos veces con la solución Reblot 1X a 37°C en agitación durante 30 minutos. Sucesivamente se volvió a lavar de la misma manera e incubar con ECL durante 4 minutos en agitador.
- Una incubación a 4° durante toda la noche tras las anteriores incubaciones a 37°C. Se volvió a lavar de la misma manera que en el caso anterior y se volvió a incubar con la solución Reblot 1X durante toda la noche a 4°C, en agitación.

Lipofección y eficiencia de transfección

Se siguió con la lipofección y el cálculo de la eficiencia de transfección. Para el silenciamiento de *MED12* se emplearon dos productos distintos: Dharma FECT 1 Transfection Reagent (Cultek) y Lipofectamina 3000 (Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se emplearon GapmeRs frente a *MED12* (concentración final 50 nM) marcados con FAM, GapmeR control positivo frente a *GAPDH* (concentración final de 25 nM) también marcados con FAM y GapmeR control negativo (Scrambled SCR con concentración final de 25 nM) que no se une a ningún ARNm de la célula. Para realizar la transfección, se preparó la mezcla para la formación de los liposomas y por otro lado la mezcla de cada uno de los GapmeRs. Tras incubar 5 minutos, la mezcla de GapmeR se añade a la del agente transfectante gota a gota evitando que toque las paredes del tubo. Se deja reposar la mezcla 20 minutos y finalmente se añade gota a gota en el pocillo de 24 conteniendo las células en un volumen final de 400 μ l de DMEM sin suero. La placa se incubó a 37°C y 5% CO₂.

Tras 24 horas las células se levantaron de las placas que se muestran en las Figuras 5 y 6 con 3 réplicas técnica para cada uno de los experimentos (cada réplica correspondiente a un pocillo). En total se realizaron 4 ensayos diferentes: células transfectadas con GapmeR frente a *MED12*, células transfectadas con GapmeR frente a *GAPDH*, células control sin transfectar para determinar la auto-fluorescencia celular y células no transfectadas para determinar la muerte celular.



Figuras 5-6. Distribución de las diferentes condiciones en la placa para citometría. Por cada experimento empleamos tres pocillos para conseguir el número de células adecuado para su detección con el citómetro.

Las células se levantaron usando tripsina, se lavaron con PBS 1X y se mantuvieron en hielo hasta su análisis en el citómetro. Antes de analizar cada muestra, las células se

incubaron para obtener una dilución final de 1:1000 de yoduro de propidio (IP) durante 5 minutos en oscuridad, menos aquellas usadas para medir la auto-fluorescencia celular. En el citómetro se analizaron 50 µl de la suspensión celular y se midieron entre 10.000 y 20.000 eventos por réplica. Las células se excitaron con láser verde (FL-1) y con láser rojo (FL-3) para detectar la señal con los fluoróforos. Los datos obtenidos se analizaron con el programa Accuri Start Up.

qPCR para determinar silenciamiento a nivel de ARNm

También se quiso determinar el porcentaje de silenciamiento a nivel de ARNm mediante qPCR. Para ello, se siguieron los siguientes pasos:

Extracción del ARN

A las 72 horas tras la transfección se extrajo el ARN de las células utilizando el kit de extracción de ARN Quick-RNA Microprep Kit (Zymo Research) y el ADN genómico residual se eliminó incubando las muestras con DNasa I (Promega Corp. Madison, WI, EE. UU.) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

Retrotranscripción (RT-PCR)

Antes de realizar la retrotranscripción, se añadieron 2 µl de hexámeros aleatorios (5 µM, Roche) y 1 µl de Oligo-dT (2,5 µM, Jena) a los 11 µl de ARN (0,5 µg de ARN) de cada muestra y se desnaturalizaron a 65°C durante 5 minutos. Los tubos se dejaron en hielo durante 5 minutos y, tras ello, se añadieron a cada tubo 11 µl de la mezcla de retrotranscripción consistente en 5 µl de tampón 5X, 1,25 µl de dNTPs 10 mM, 3,75 µl agua-DEPC y 1 µl (200 unidades) de M-MLV (Promega). A continuación, se desarrolló la retrotranscripción con el siguiente perfil térmico: 5'- 65°C, 10'- 25°C, 60'- 50°C, 5'- 85°C. Una vez finalizada, se hizo una dilución 1/12 de cada muestra de ADN complementario (ADNc).

PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR)

El ADNc obtenido se amplificó mediante PCR a tiempo real o cuantitativa (qPCR). Para ello, se empleó el kit 2X qPCRBIO SyGreen Mix Lo-Rox (PCRBiosystems London, UK) el cual contiene SYBR Green como agente intercalante. En las placas de 384 pocillos se realizaron las reacciones en un volumen final de 5 µl con una composición de 2,5 µl de 2X qPCRBIO SyGreen Mix Lo-Rox, 0,125 µl (0,25 µM) de cada cebador y 2,25 µl de la dilución 1/12 del ADNc. En este experimento se realizaron tres réplicas técnicas por muestra de ADNc.

La qPCR se utilizó usando el termociclador LightCycler® 480 II (Roche) con el siguiente perfil térmico: 2' - 95°C (10''-95°C, 20''-60°C; 30''- 72°C) x 40-45 ciclos. Una vez finalizada la amplificación, se comprobó la especificidad de las reacciones mediante el análisis de las curvas de fusión. Para normalizar los valores de Ct se usaron 2 genes de expresión constitutiva o housekeeping: *GNB2LI*, que codifica para las proteínas G de unión a nucleótidos de guanina y *RPL32*, que codifica para la proteína ribosomal 60S L32.

Análisis de los datos

Los datos de las placas se importaron al software de análisis de datos GenEx ver. 6.1.1.550 (MultiD Analyzes AB). La media de los Cts de las tres réplicas se usó para calcular la expresión relativa de cada gen normalizando los niveles de expresión con dos genes de referencia y calculando la expresión relativa con respecto al Scrambled.

CLIC de MED12 para determinar silenciamiento a nivel de proteína

Para determinar el silenciamiento a nivel de proteína se empleó el método del CLIC para la cuantificación de MED12 descrito previamente. Tras 48 y 72 horas de la transfección las células se fijaron, bloquearon y se incubaron toda la noche a 4°C en agitación con anticuerpo primario de GAPDH y de MED12.

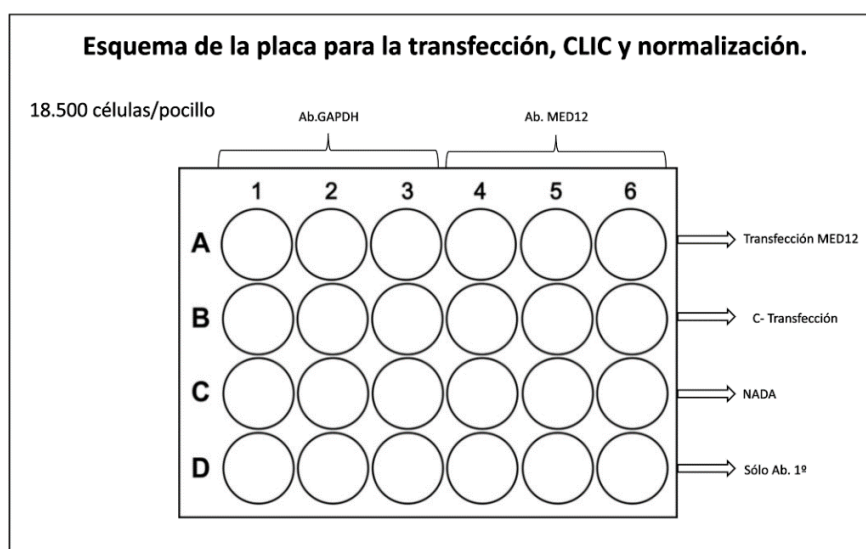


Figura 7. Distribución en la placa para realizar los ensayos de transfección, inmuno-quimioluminiscencia y normalización.

Al día siguientes, las células se lavaron y se incubaron durante 3 horas con anticuerpo secundario anti-ratón para GAPDH y anti-conejo para MED12. Tras los lavados pertinentes, se capturó la señal de las células tras la incubación con ECL.

Para cuantificar la cantidad de proteína MED12 se analizaron los archivos de imagen con Fiji/ImageJ. Primero se eligió un área de interés (AOI). El AOI utilizado era típicamente una selección circular de aproximadamente el 60% del tamaño del pocillo en la imagen, colocada aproximadamente en el centro de cada pocillo para evitar los bordes de esto, ya que provocan ruido y variabilidad en los ensayos basados en células, así como propuesto por Fisher *et al.*, 2020.

Resultados

Resultados

Cultivo celular

Las células de los cultivos primarios de endometrio crecieron presentando una morfología estirada propia de células musculares, alcanzando una afluencia del 60% tras subcultivar la placa con 18.500 células y del 80% cultivando con 22.500 células tras 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂

Eficiencia de transfección

Para el estudio del silenciamiento de *MED12*, se midió mediante citometría deflujo la eficiencia de transfección celular. Para eso, se empleó el programa BD Accuri C6 Software, se definieron los umbrales de autofluorescencia celular en el verde y en el rojo con las muestras control y, marcando estos como ejes de coordenadas, pudimos calcular una eficiencia de transfección a las 24 horas del 60-70%. Como se puede apreciar en la Figura 8, en el cuadrante 2 observamos las células que presentan fluorescencia en verde (debido a la incorporación de GapmeR con FAM), pero no en el rojo (correspondiente a la incorporación de IP, que se une al ADN, pero solo es capaz de entrar a la célula cuando esta está rota), es decir, las células transfectadas y viables.

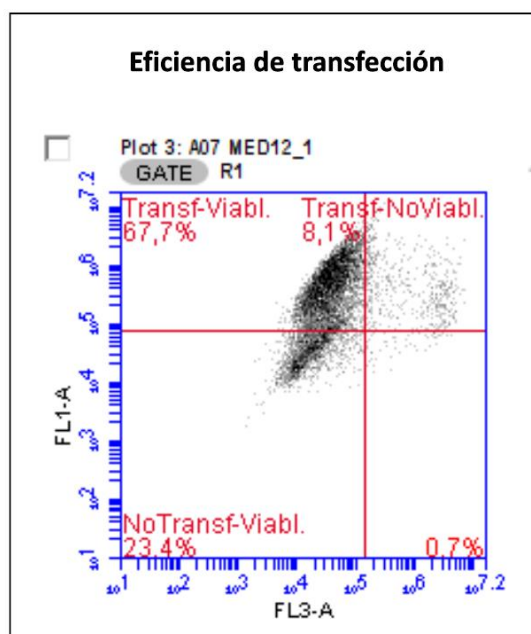


Figura 8. Gráfico de puntos para el análisis de los resultados obtenidos a partir de las muestras analizadas en el citómetro de flujo de una de las réplicas de *MED12*. En los cuadrantes podemos observar las células no viables y transfectadas (I cuadrante), las células viables y transfectadas (II cuadrante), las células viables y no transfectadas (III cuadrante) y las células no viables y no transfectadas (IV cuadrante), dependiendo si se encuentran por encima o por debajo del umbral de fluorescencia para el verde (eje y) o para el rojo (eje x).

Silenciamiento a nivel de ARNm

El porcentaje de silenciamiento a nivel de ARNm de MED12, realizado con qPCR a las 72 horas de la lipofección fue del 90,78% y se calculó con la siguiente fórmula:

$$100 - \left(\frac{1}{2}^{Ct \text{ normalizado del tratamiento (MED12)} - Ct \text{ normalizado del control (C-)}} * 100 \right)$$

El valor del fold-change fue de 0,0922 (Figura 9).

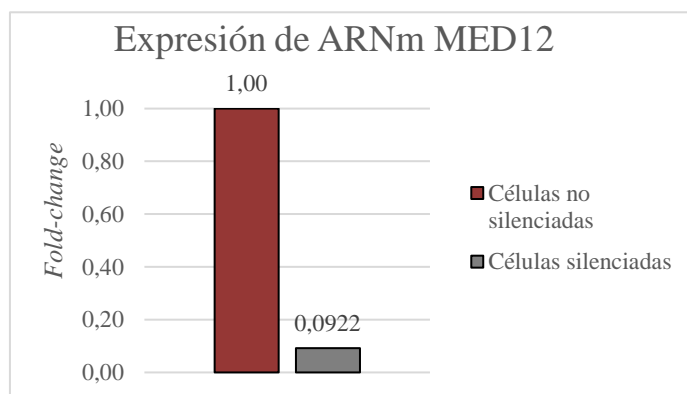


Figura 9. Fold-change de ARNm de MED12, normalizado respecto al grupo control.

Silenciamiento a nivel de proteína

Para la cuantificación de proteínas MED12, con el método CLIC, previamente se obtuvieron los resultados sobre las diluciones de anticuerpos a utilizar con el fin de optimizar la técnica para el estudio de MED12.

Diluciones de anticuerpos secundarios

Los resultados que se presentan a continuación pertenecen al estudio de las diluciones de anticuerpos secundarios. Tras la obtención de las imágenes con el transiluminador (Figura 10), se escogieron las diluciones que tuvieran una señal mínima para reducir el ruido de fondo a la hora del análisis de las imágenes con el Fiji/ImageJ. Se eligió la dilución 1:20.000 para ambos anticuerpos secundarios.

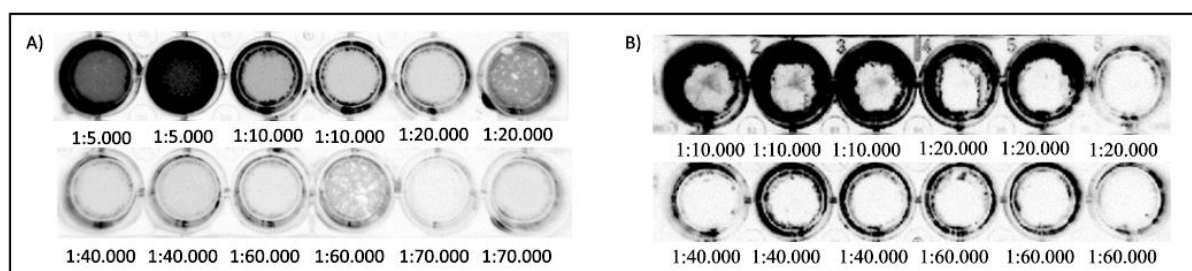


Figura 10. Imágenes obtenidas con el transiluminador; A) diluciones del anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (JAC-115-035-003); B) diluciones del anticuerpo secundario de cabra anti-ratón (JAC-115-035-114).

Diluciones de anticuerpos primarios

En cuanto a las diluciones de anticuerpos primarios se escogieron las que presentaran señal, pero sin saturarse e intentando dar preferencia a las más diluidas para reducir el coste de la técnica. Se eligió la dilución 1:1000 para MED12 y 1:100 para GAPDH (Figura 11).

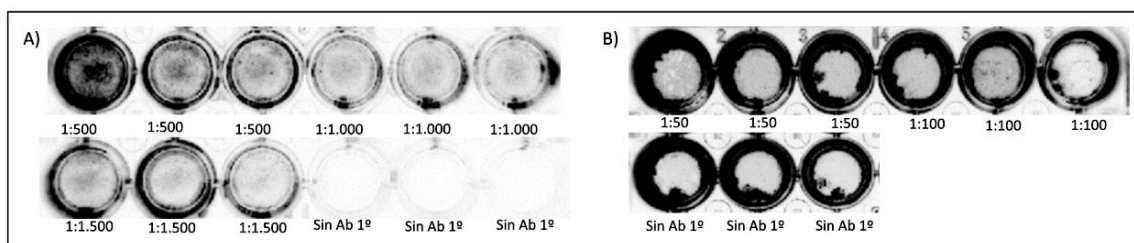


Figura 11. Imágenes obtenidas con el transiluminador; A) incubando con anticuerpo primario Abcam 70842 anti-MED12 y sucesivamente con anticuerpo secundario anti-conejo; B) incubando con anticuerpo primario Mab5718-R&D Systems anti-GAPDH y sucesivamente con anticuerpo secundario anti-ratón.

Eliminación de anticuerpos primarios

La eliminación de anticuerpos primarios después de la medición de los niveles de MED12 para la normalización nos hubiera permitido volver a emplear las mismas células y así eliminar la posible variación entre un pocillo y otro en cuanto al número de células presentes. Sin embargo, tras los varios ensayos con la solución Reblot Plus Strong Antibody Stripping Solution (Merk) en concentración 1X, la señal seguía presente (Figura 12).

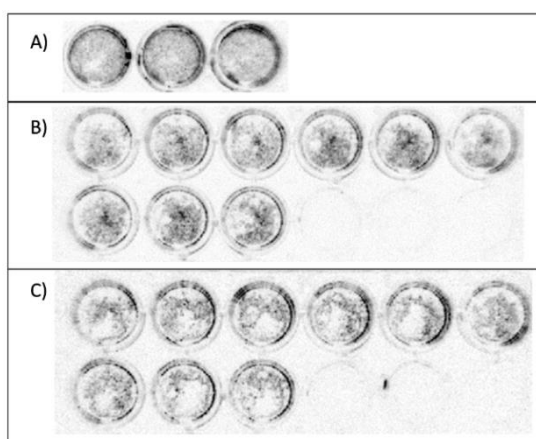


Figura 12. Imágenes obtenidas con el transiluminador tras la realización del stripping con Reblot 1X (Merk) A) con dos incubaciones de 20 minutos a temperatura ambiente; B) con dos incubaciones de 30 minutos a 37°C; C) con dos incubaciones de 30 minutos a 37°C y dejándolo toda la noche a 4°C.

Con el primer ensayo la señal seguía intensa (Figura 12.A). Incubando la placa dos veces a 37°C durante 30 minutos la señal disminuía levemente (Figura 12.B) y tras volver a incubar la placa durante toda la noche a 4°C, aunque la señal seguía

disminuyendo se comprobó al microscopio que las calvas que se presentaban (Figura 12.C) eran debido a que las células se habían despegado de los pocillos. Para eso se optó por realizar la normalización en pocillos distintos.

Cuantificación de proteínas

La señal que se obtuvo tras la realización del CLIC para la cuantificación de la proteína MED12 a las 48, 72 y 96 horas se observa en la Figura 13.

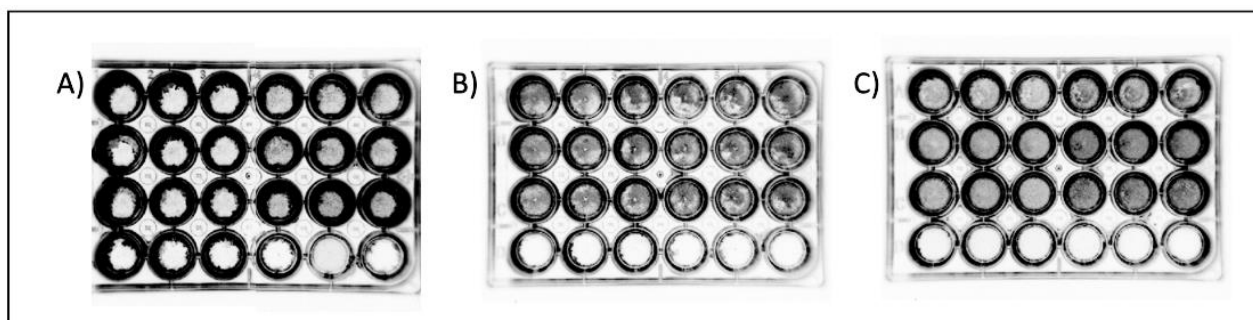


Figura 13. Detección quimioluminiscente por el método CLIC de las proteínas MED12 y GAPDH 48h (A), 72h (B) y 96h (C) tras el silenciamiento génico de MED12. Las imágenes fueron obtenidas a los 155 segundos (A) y a los 30,7 segundos (B y C) de exposición, momentos en los que la señal era apreciable sin saturación excesiva de los bordes.

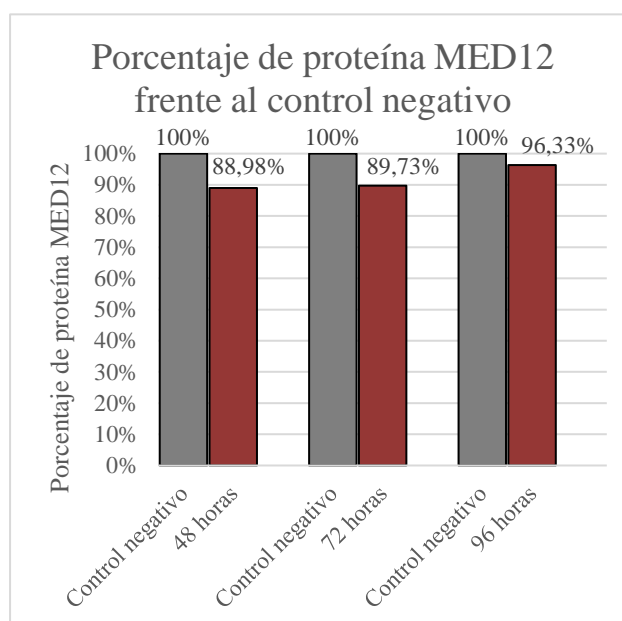


Figura 14. Porcentaje de proteína MED12 detectadas en los tres tiempos de ensayo respecto a los porcentaje en las células control (control negativo).

Se midió la densidad integral promedio eliminando el ruido de fondo y tras la normalización de los datos, se ha podido observar un silenciamiento aproximado del 10% a las 48 y 72 horas y del 4% a las 96 horas, así como muestra la Figura 14. Se observa una expresión a nivel de proteína menor a las 48 y 72 horas que a las 96 horas.

En resumen, las células del cultivo primario de endometrio presentan alto silenciamiento a nivel de ARNm y una disminución leve de la cantidad de proteína. La cuantificación de MED12 con el método CLIC ha sido analizada y optimizada en específico para este ensayo, llegando a conocer las concentraciones de anticuerpos primarios y secundarios a utilizar y realizando la normalización sin el empleo de la solución de Reblot.

Discusión

Discusión

Los leiomiomas son tumores benignos que se presentan cada vez con más frecuencia en la población (Mäkinen *et al.*, 2011), sin embargo, son poco estudiados. El empleo de cultivos celulares primarios de miometrio en la investigación, dedicado a futuros fines farmacéuticos, desempeña un papel fundamental, ya que mantienen una notable fidelidad a las características intrínsecas de los tejidos en su entorno natural, obteniendo una representación más precisa y fiable de la fisiología y respuesta celular *in situ* (Dairkee *et al.*, 2004), por lo que probar en estos cultivos posible diana terapéutica se hace necesario, debido a que actualmente la cirugía es el tratamiento principal.

Es por eso por lo que en este trabajo nos centramos en el gen *MED12* como posible diana terapéutica y se quiso estudiar como el silenciamiento de la expresión de este gen podría ser clave para el estudio del comportamiento de los leiomiomas.

En primer lugar, en relación con el silenciamiento del gen *MED12*, se observó una alta disminución en los niveles de ARNm, implicando un funcionamiento óptimo de la transfección. Sin embargo, los niveles de la proteína MED12 no disminuyen como cabía esperar. Esta falta de reducción puede ser atribuida a diversas razones. Una posibilidad es que la proteína MED12 tenga una vida media prolongada, lo que podría mantener la señal de la proteína estable y saturada durante el tiempo de estudio. Esta estabilidad proteica está relacionada con su papel esencial en la regulación de la transcripción génica, como se ha señalado en investigaciones anteriores (González, C. G. *et al.*, 2022). Además, hay que tener en cuenta que, durante la incubación, las células se siguen dividiendo tras la lipofección y estas células no estarán silenciadas.

Otra explicación plausible es que el anticuerpo primario policlonal utilizado para detectar la proteína MED12 pueda unirse de manera inespecífica a otros epítomos, dificultando la detección precisa de la disminución real de la proteína. Además, aunque la reducción observada en los niveles proteicos sea leve, es posible que esta cantidad sea suficiente para tener un efecto biológico.

Considerando estos resultados, sería interesante replicar los experimentos utilizando anticuerpos monoclonales específicos para MED12 y/o realizar estudios adicionales para evaluar la estabilidad de la proteína. Estos enfoques podrían brindar una mayor precisión en la

detección de los cambios en los niveles proteicos y proporcionar una comprensión más completa de los efectos del silenciamiento de *MED12* en los cultivos celulares.

Por otra parte, en este estudio se empleó el método CLIC para la cuantificación de proteínas, el cual presentó ventajas y desventajas. Este método permitió el uso de reactivos comunes y equipos no altamente especializados, posibilitó la detección de proteínas de alto peso molecular como es el caso de la proteína MED12 (280 kDa), a diferencia del Western Blot, con un rango recomendado entre 10 kDa y 250 kDa y permitiendo un ensayo en células enteras y sin desnaturalización de las proteínas, lo que puede conllevar la unión de anticuerpos a epítopos inespecíficos. También, proporciona una señal estable y libre de ruido de fondo: a diferencia de técnicas como la inmunofluorescencia, en el CLIC no se detectó fluorescencia de los reactivos, lo que contribuyó a una mayor precisión de los resultados. Además, se minimizó la manipulación de las muestras, lo que permitió aumentar la reproducibilidad del ensayo.

Sin embargo, es importante tener en cuenta algunas consideraciones. La elección del anticuerpo es crucial para una cuantificación precisa de la proteína objetivo, ya que la especificidad del anticuerpo evita uniones inespecíficas y posibles falsos positivos. Es necesario emplear agentes de bloqueo y tiempos de incubación adecuados para evitar uniones no deseadas del anticuerpo. Además, las diluciones de los anticuerpos son altamente concentradas, lo que puede requerir una cantidad elevada de estos reactivos y puede encarecer desproporcionadamente la obtención de resultados.

Comparando nuestros ensayos con los realizados por Fisher (2020), por un lado, pudimos comprobar que la adición del Tritón-X100 al 0,01% en las diluciones de anticuerpos no era eficiente en nuestros ensayos, ya que dañaba a la integridad celular y eliminaba la señal detectada por el transiluminador. Por lo tanto, se optó por emplear este detergente solo en el paso de permeabilización celular.

Por otro lado, en cuanto a la eliminación de anticuerpos primarios para poder volver a emplear las mismas células para la normalización y así reducir un posible factor de error, las pruebas con la solución de Reblot no eliminaron los anticuerpos y, debido a la limitación de tiempo para este trabajo, se optó para emplear otros pocillos, teniendo presente la posible variación en el número de células. Como futuro ensayo, se propone probar con una solución de ácido acético al 10% a distintos tiempos de incubación y temperaturas. El ácido acético es capaz de inactivar la enzima del anticuerpo secundario y volver a emplear las mismas células

incubándolas con anticuerpos primarios anti-GAPDH y anticuerpos secundarios (de distinta especie para evitar uniones no deseadas al anticuerpo primario anti-MED12) e incluyendo un control para comprobar que las células no se vean afectadas por las incubaciones (Han *et al.*, 2020).

En resumen, a pesar de las consideraciones mencionadas, el método CLIC proporciona una valiosa herramienta para la cuantificación relativa de la proteína nuclear MED12. Su aplicación en futuros experimentos con anticuerpos monoclonales específicos y estudios adicionales sobre la estabilidad de la proteína permitirán una mayor comprensión de los efectos del silenciamiento de *MED12* en los cultivos celulares.

Conclusiones

Conclusiones:

1. El silenciamiento del gen *MED12* mediante lipofección con GapmeRs específicos muestra un alto porcentaje de silenciamiento a nivel de ARNm.
2. El silenciamiento a nivel de proteína *MED12* es menor al esperado en relación al silenciamiento a nivel de ARNm obtenido, lo que puede deberse a una inespecificidad del anticuerpo.
3. El método CLIC es un método muy útil para cuantificar proteínas en su conformación original, que permite emplear materiales comunes en un laboratorio y disminuir errores de manipulación. Sin embargo, las altas concentraciones de anticuerpos requeridos encarecen el método.

Conclusions:

1. Silencing of the *MED12* gene through lipofection with specific GapmeRs shows a high percentage of mRNA silencing.
2. *MED12* protein level silencing is lower than expected in relation to the mRNA-level silencing achieved, which may be due to antibody nonspecificity.
3. The CLIC method is a very useful technique for quantifying proteins in their native conformation, which allows the use of common laboratory materials and reduces handling errors. However, the high concentrations of antibodies required can increase the cost of the method.

Agradecimientos

En primer lugar, quiero expresar mi profundo agradecimiento a mis tutoras, Dra. María Teresa Acosta Almeida y Dra. Lisandra Muñoz Hidalgo, por sus orientación y apoyo a lo largo de mi proyecto de fin de grado. Sus dedicación, conocimiento y paciencia han sido fundamentales para el éxito de este trabajo y me han permitido acercarme y amar el mundo de la investigación científica. Estoy enormemente agradecida por sus guía y mentoría, que han dejado una huella duradera en mi formación académica y profesional. Agradezco también a las doctorandas Paula Vásquez Fernández y Silvia Beltrán Flores por estar siempre disponibles a ayudarme y aconsejarme, haciéndome sentir parte del equipo.

En segundo lugar, quería agradecer a mi familia y a mis amigos que han sido una fuente inagotable de apoyo, aliento y risas a lo largo de esta etapa académica. Sus compañía y palabras han sido fundamentales para mantenerme motivada y mantener un equilibrio entre el estudio y la diversión. Agradezco su comprensión cuando tuve que ausentarme en momentos importantes debido a mis compromisos académicos, y por estar siempre dispuestos a escucharme y brindarme su apoyo incondicional. Gracias por ser parte de mi vida y por celebrar juntos cada logro alcanzado.

Finalmente, me gustaría dar las gracias a todos los miembros del IUETSPC para su colaboración y amabilidad y a los profesores del grado de biología de la ULL, ya que sin ellos no podría haber llegado a adquirir la formación que hoy tengo como bióloga.

Bibliografía

Bibliografía

- Braasch, D. A., & Corey, D. R. (2001). *Locked nucleic acid (LNA): fine-tuning the recognition of DNA and RNA*. *Chemistry & biology*, 8(1), 1-7. [https://doi.org/10.1016/S1074-5521\(00\)00058-2](https://doi.org/10.1016/S1074-5521(00)00058-2)
- Bulun, S. E. (2013). *Uterine fibroids*. *New England Journal of Medicine*, 369(14), 1344-1355. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1209993>
- Cañas, R., Pascual, M. B., & Fernando, M. (2016). *Una asignatura pendiente: la normalización de la RT-qPCR*. *Encuentros en la Biología*, 10(162), 212-214. ISSN-e 1134-8496.
- Corrales, A. C. J., Vargas, J. K. C., de Quesada Arceo, S., Guerra, J. M., Espinosa, M. A., & Leiva, R. F. (2015). *Mioma uterino: Un trastorno frecuente en mujeres en edad fértil*. 16 de abril, 54(257), 59-70. <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumenI.cgi?IDARTICULO=59201>
- Dairkee, S. H., Ji, Y., Ben, Y., Moore, D. H., Meng, Z., & Jeffrey, S. S. (2004). *A molecular signature of primary breast cancer cultures; patterns resembling tumor tissue*. *BMC genomics*, 5(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-5-47>
- DeVos, S. L., & Miller, T. M. (2013). *Antisense oligonucleotides: treating neurodegeneration at the level of RNA*. *Neurotherapeutics*, 10, 486-497. <https://doi.org/10.3791/50326>
- Dias, N., & Stein, C. A. (2002). *Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms*. *Molecular cancer therapeutics*, 1(5), 347-355. ISSN 1538-8514.
- Fisher, J., Sørensen, O. E., & Abu-Humaidan, A. H. (2020). *Using chemiluminescence imaging of cells (CLIC) for relative protein quantification*. *Scientific Reports*, 10(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75208-0>
- Fisher, W. C., & Helwig, E. B. (1963). *Leiomyomas of the skin*. *Archives of Dermatology*, 88(5), 510-520. <https://doi.org/10.1001/archderm.1963.01590230018002>
- Flake, G. P., Andersen, J., & Dixon, D. (2003). *Etiology and pathogenesis of uterine leiomyomas: a review*. *Environmental health perspectives*, 111(8), 1037-1054. <https://doi.org/10.1289/ehp.5787>
- González, C. G., Akula, S., & Burleson, M. (2022). *The role of mediator subunit 12 in tumorigenesis and cancer therapeutics*. *Oncology letters*, 23(3), 1-8. <https://doi.org/10.3892/ol.2022.13194>
- Han, S., Cui, Y., & Helbing, D. L. (2020). *Inactivation of horseradish peroxidase by acid for sequential chemiluminescent western blot*. *Biotechnology Journal*, 15(3), 1900397. <https://doi.org/10.1002/biot.201900397>
- He, C., Nelson, W., Li, H., Xu, Y. D., Dai, X. J., Wang, Y. X., Ding, Y. B., Li, Y. P., & Li, T. (2021). *Frequency of MED12 mutation in relation to tumor and patient's clinical characteristics: a meta-analysis*. *Reproductive Sciences*, 1-9. <https://doi.org/10.1007/s43032-021-00473-x>
- Hnasko, T. S., & Hnasko, R. M. (2015). *The western blot. ELISA: Methods and Protocols*, 87-96. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2742-5_9
- Jensen, E. C. (2012). *The basics of western blotting*. *Anat. Rec. Hoboken*, 295, 369-371. <https://doi.org/10.1002/ar.22424>
- Kim, Y. G., Baltabekova, A. Z., Zhiyenbay, E. E., Aksambayeva, A. S., Shagyrova, Z. S., Khannanov, R., Ramanculov, E. R. & Shustov, A. V. (2017). *Recombinant Vaccinia virus-coded interferon inhibitor B18R: Expression, refolding and a use in a mammalian expression system with a RNA-vector*. *PLoS One*, 12(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189308>
- Lindner, V., & Reidy, M. A. (1991). *Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(9), 3739-3743. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.9.3739>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). *Western blot: technique, theory, and trouble shooting*. *North American journal of medical sciences*, 4(9), 429. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mäkinen, N., Mehine, M., Tolvanen, J., Kaasinen, E., Li, Y., Lehtonen, H. J., Gentile, M., Yan, J., Enge, M., Taipale, M., Aavikko, M., Katainen, R., Virolainen, E., Böhlting, T., Koski, T. A., Launonen, V., Sjöberg, J., Taipale, J., Vahteristo, P. & Aaltonen, L. A. (2011). *MED12, the mediator complex subunit 12 gene, is mutated at high frequency in uterine leiomyomas*. *Science*, 334(6053), 252-255. <https://doi.org/10.1126/science.1208930>
- Mangrulkar, R. S., Ono, M., Ishikawa, M., Takashima, S., Klagsbrun, M., & Nowak, R. A. (1995). *Isolation and characterization of heparin-binding growth factors in human leiomyomas and normal myometrium*. *Biology of reproduction*, 53(3), 636-646. <https://doi.org/10.1095/biolreprod53.3.636>
- Marshall, L. M., Spiegelman, D., Barbieri, R. L., Goldman, M. B., Manson, J. E., Colditz, G. A., Willet, W. C. & Hunter, D. J. (1997). *Variation in the incidence of uterine leiomyoma among premenopausal women by age and race*. *Obstetrics & Gynecology*, 90(6), 967-973. [https://doi.org/10.1016/S0029-7844\(97\)00534-6](https://doi.org/10.1016/S0029-7844(97)00534-6)

- Mittal, P., Shin, Y. H., Yatsenko, S. A., Castro, C. A., Surti, U., & Rajkovic, A. (2015). *Med12 gain-of-function mutation causes leiomyomas and genomic instability*. The Journal of clinical investigation, 125(8), 3280-3284. <https://doi.org/10.1172/JCI81534>
- Pillai-Kastoori, L., Schutz-Geschwender, A. R., & Harford, J. A. (2020). *A systematic approach to quantitative Western blot analysis*. Analytical biochemistry, 593, 113608. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113608>
- Reece, K. S., McElroy, D., & Wu, R. (1992). *Function and evolution of actins*. Evolutionary Biology: Volume 26, 1-34. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3336-8_1
- Rein, M. S. (2000). *Advances in uterine leiomyoma research: the progesterone hypothesis*. Environ Health Perspect 108(suppl 5):791–793. <https://doi.org/10.1289/ehp.00108s5791>
- Richards, P. A., & Tiltman, A. J. (1996). *Anatomical variation of the oestrogen receptor in the non-neoplastic myometrium of fibromyomatous uteri*. Virchows Archiv, 428, 347-351. <https://doi.org/10.1007/BF00202201>
- Risheg, H. et al. (2007). *A recurrent mutation in MED12 leading to R961W causes Opitz-Kaveggia syndrome*. Nature Genetics, 39(4), 451-453. <https://doi.org/10.1038/ng1992>
- Schwartz, S. M., Marshall, L. M., & Baird, D. D. (2000). *Epidemiologic contributions to understanding the etiology of uterine leiomyomata*. Environmental health perspectives, 821-827. <https://doi.org/10.2307/3454313>
- Thyresson, H. N., & Su, W. D. (1981). *Familial cutaneous leiomyomatosis*. Journal of the American Academy of Dermatology, 4(4), 430-434. [https://doi.org/10.1016/S0190-9622\(81\)70042-2](https://doi.org/10.1016/S0190-9622(81)70042-2)
- Zainuddin, A., Chua, K. H., Rahim, N. A., & Makpol, S. (2010). *Effect of experimental treatment on GAPDH mRNA expression as a housekeeping gene in human diploid fibroblasts*. BMC Molecular Biology, 11, 1-7. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-11-59>
- Zhang, S., O'Regan, R., & Xu, W. (2020). *The emerging role of mediator complex subunit 12 in tumorigenesis and response to chemotherapeutics*. Cancer, 126(5), 939-948. <https://doi.org/10.1002/cncr.32672>