



UNIVERSIDAD DE VALLADOLID - FACULTAD DE MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN BIOMEDICINA Y TERAPIAS AVANZADAS



EVALUACIÓN DEL EFECTO DE UN INHIBIDOR DE STAT5 EN UN MODELO *IN VITRO* DE INVOLUCIÓN POSTLACTANCIA

*Evaluation of the effect of an inhibitor of STAT5 in an in vitro model of
postlactational involution*

Autor/a: D^a. Ester Sanz Palacios

Tutor/es: D. Jesús Pérez Losada y D^a. M^a Mercedes Durán Domínguez

RESUMEN

Introducción

El cáncer de mama es el tumor más común y mortal en mujeres, y las estrategias actuales de quimioprevención son escasas y poco tolerables. La inhibición de la vía JAK2/STAT5, clave en la lactancia, podría favorecer la involución postlactancia, proceso vinculado a menor riesgo tumoral. Aunque estudios *in vivo* apuntan a un efecto beneficioso al inhibir STAT5, su mecanismo molecular directo sigue sin esclarecerse.

Material y métodos

Se utilizó la línea celular epitelial mamaria HC11. Tras inducir la diferenciación lactogénica, se simuló la involución y se trató con un inhibidor no peptídico de STAT5 (iSTAT5). Se evaluó la viabilidad celular (MTT), la apoptosis (detección de caspasa-3 activa por Western blot), los niveles de mRNA de *Stat5a* y *Stat5b* (RT-qPCR), y los niveles proteicos de STAT5 total y fosforilado (p-STAT5) (Western blot). Se estudió la estabilidad de STAT5 mediante tratamiento con cicloheximida. La significación estadística se determinó mediante la prueba t de Student y ANOVA ($p < 0,05$).

Resultados

El tratamiento con el inhibidor de STAT5 redujo la viabilidad celular de forma dosis-dependiente e indujo un aumento significativo de la apoptosis. Además, se observó una disminución en los niveles de STAT5 fosforilado (p-STAT5), sin cambios relevantes en los niveles totales de STAT5.

Conclusiones

La inhibición de STAT5 potencia características clave del proceso de involución postlactancia en células HC11, incluyendo la pérdida de viabilidad y la activación de apoptosis. Estos resultados sugieren que el uso de inhibidores de STAT5 podría representar una estrategia prometedora de quimioprevención frente al cáncer de mama.

Palabras clave: STAT5, Cáncer de mama, Involución postlactancia, Quimioprevención

ABSTRACT

Background

Breast cancer is the most common and deadly tumour in women, and current chemoprevention strategies are limited and poorly tolerated. Inhibition of the JAK2/STAT5 pathway, which is key in lactation, could promote post-lactation involution, a process associated with lower tumour risk. Although in vivo studies suggest a beneficial effect of inhibiting STAT5, the direct molecular mechanism remains unclear.

Methods

The mammary epithelial cell line HC11 was used. After inducing lactogenic differentiation, involution was simulated and treated with a non-peptidic STAT5 inhibitor (iSTAT5). Cell viability (MTT), apoptosis (detection of active caspase-3 by Western blot), Stat5a and Stat5b mRNA levels (RT-qPCR), and total and phosphorylated STAT5 (p-STAT5) protein levels (Western blot) were assessed. STAT5 stability was studied by treatment with cycloheximide. Statistical significance was determined by Student's t-test and ANOVA ($p < 0.05$).

Findings

Treatment with the STAT5 inhibitor reduced cell viability in a dose-dependent manner and induced a significant increase in apoptosis. In addition, a decrease in phosphorylated STAT5 (p-STAT5) levels was observed, with no relevant changes in total STAT5 levels.

Conclusions

STAT5 inhibition potentiates key features of the postlactational involution process in HC11 cells, including loss of viability and activation of apoptosis. These results suggest that the use of STAT5 inhibitors may represent a promising strategy for breast cancer chemoprevention.

Keywords: STAT5, Breast cancer, Post-lactational involution, Chemoprevention

ÍNDICE

1. Introducción y Justificación.....	1
1.1. Epidemiología del cáncer de mama	1
1.2. Importancia y relación de la historia reproductiva y el cáncer de mama	1
1.2.1. Relación ambivalente entre la edad del primer embarazo, la lactancia y el riesgo a desarrollar cáncer de mama	1
1.3. Relación entre la involución postlactancia y la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama	3
1.4. Quimioprevención del cáncer de mama	3
1.5. Papel de la vía JAK2/STAT5 durante la lactancia y la involución	4
2. Hipótesis y Objetivos.....	5
2.1. Antecedentes y justificación del estudio	5
2.2. Hipótesis de trabajo	6
2.3. Objetivo general y objetivos específicos	6
3. Material y métodos	6
3.1. Modelo <i>in vitro</i> de involución postlactancia: línea celular HC11 y condiciones de cultivo	6
3.2. Inhibidor de STAT5.....	7
3.3. Estudio de la viabilidad celular mediante ensayo MTT	7
3.4. Extracción de RNA y estudio de la expresión génica mediante RT-qPCR	8
3.5. Lisis celular, extracción de proteínas y western blot	9
3.6. Evaluación de la degradación proteica mediante ensayo con cicloheximida.....	10
3.7. Análisis estadístico de los datos	10
4. Resultados	11
4.1. El inhibidor de STAT5 disminuye la viabilidad celular potenciando la muerte celular por apoptosis.....	11
4.2. Evaluación del efecto del inhibidor de STAT5 (iSTAT5) sobre la expresión génica y proteica de STAT5	12
4.3. Estabilización de los niveles de STAT5 total en presencia del inhibidor	13
5. Discusión	14
6. Conclusiones.....	16
7. Bibliografía	17

1. Introducción y Justificación

1.1. Epidemiología del cáncer de mama

El cáncer de mama es la neoplasia más diagnosticada y que más muertes causa en mujeres en todo el mundo (1). Además, se estima que, dentro de 20 años, la cifra de nuevos diagnósticos de cáncer de mama al año supere los 3 millones. Según los datos publicados por la *Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer* (IARC), en 2022 se diagnosticaron 2,3 millones de nuevos casos de cáncer de mama, que suponen un 11,5% de todos los diagnósticos de cáncer en todo el mundo. En cuanto a la mortalidad, el cáncer de mama fue el cuarto tumor que más muertes produjo en el mundo, considerando ambos sexos y el que más muertes provocó en la población femenina, con más de 665.000 casos en 2022 (2,3).

En España, el cáncer de mama es el segundo tumor en incidencia, considerando ambos sexos, con cerca de 35.000 casos en 2022, lo que supone un 12,5% de todos los diagnósticos. Además, es el cáncer con mayor incidencia en las mujeres, con el 28,9% de los diagnósticos. En cuanto a la mortalidad, es el cuarto tumor que más muertes produjo en España en 2022, considerando ambos sexos, provocando más de 6.800 muertes (2).

1.2. Importancia y relación de la historia reproductiva y el cáncer de mama

El cáncer de mama supone un problema de salud a nivel mundial por su elevada frecuencia en la población. Ello en parte es debido al aumento de la esperanza de vida, puesto que la edad avanzada es el factor de riesgo que más influye en el cáncer de mama.

Se han descrito, además, otros factores de riesgo asociados al desarrollo del cáncer de mama, incluidos: (i) factores genéticos, (ii) factores ambientales y (iii) otros factores como el sexo, los antecedentes familiares, la densidad mamaria y la historia reproductiva (4–6).

1.2.1. Relación ambivalente entre la edad del primer embarazo, la lactancia y el riesgo a desarrollar cáncer de mama

La historia reproductiva es uno de los factores epidemiológicos con mayor influencia en el riesgo de desarrollar cáncer de mama. El embarazo a una edad temprana protege **a largo plazo** contra esta enfermedad, especialmente cuando el primero ocurre antes de los 20 años, lo que reduce el riesgo hasta un 50% en comparación con las mujeres que no tuvieron ningún embarazo (7,8). Asimismo, si la edad del primer embarazo se encuentra entre los 20 y 30 años también proporciona una protección a largo plazo en

grado variable, con una protección adicional del 10% por cada uno de los nuevos embarazos (9).

La protección ejercida por el embarazo disminuye a medida que aumenta la edad del primer embarazo, siendo prácticamente inexistente alrededor de los 30 años e invirtiéndose este efecto protector a un aumento del riesgo después de los 30-35 años (**Figura 1**) (7).

Por otro lado, **a corto plazo**, existe un período de hasta unos 10 años tras el parto en el que existe un incremento del 10-15% del riesgo de padecer cáncer de mama. Este riesgo es mayor cuanto más tarde tiene lugar el primer embarazo, es lo que se denomina cáncer de mama post-embarazo, y se considera de mal pronóstico (9–11) (**Figura 1**).

El retraso del primer embarazo es cada vez más frecuente en el mundo occidental y, como factor de riesgo, contribuye al aumento de la incidencia del cáncer de mama. De hecho, desde mediados del siglo XXI se ha observado un cambio en la historia reproductiva de las mujeres, con una reducción en el número de embarazos y un retraso progresivo del primero.

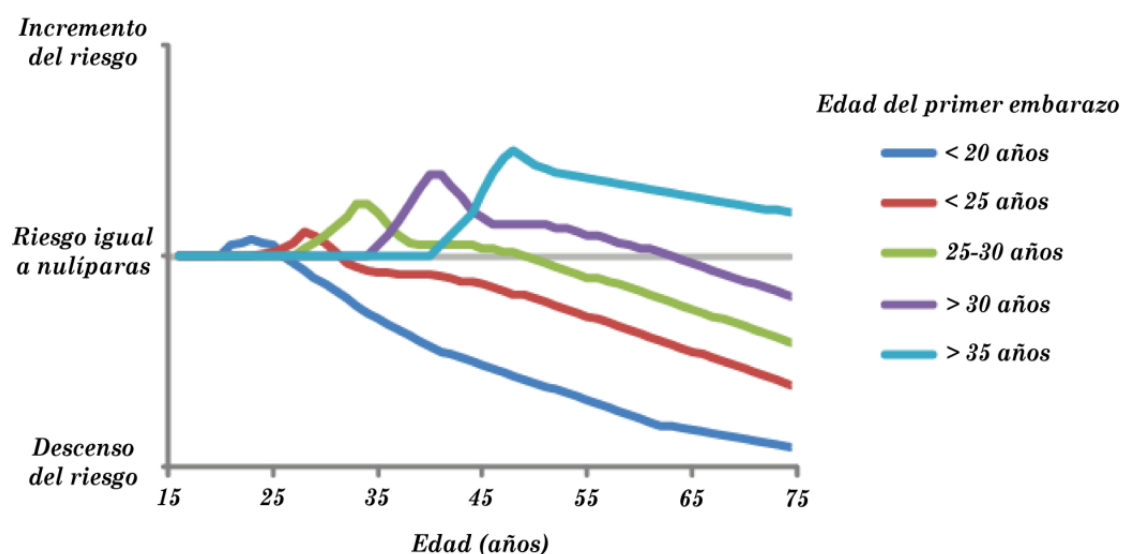


Figura 1. Efecto de la edad del primer embarazo en el riesgo a desarrollar cáncer de mama.

La imagen ilustra cómo el riesgo de cáncer de mama disminuye de forma muy evidente a largo plazo cuando el primer embarazo ocurre a una edad más temprana, mientras que se incrementa al retrasarse este. A corto plazo, el efecto protumoral del primer embarazo también es más evidente después de los 30-35 años. Figura ilustrativa tomada y modificada de Meier-Abt, F., & Bentires-Alj, M. (2014)(8).

Aunque el embarazo es el principal responsable de la mayor parte de esta protección (12), la lactancia también contribuye, con una reducción del riesgo cercana al 4% si supera los seis meses (13).

1.3. Relación entre la involución postlactancia y la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama

El proceso de involución postlactancia consiste en una serie de cambios y remodelaciones que experimenta la glándula mamaria una vez terminada la lactancia y que restauran la apariencia anatómica e histológica del órgano a un estado similar al que tenía antes del embarazo (14).

La involución postlactancia ha sido vinculada con el aumento del riesgo de cáncer de mama. Este fenómeno se ha relacionado con la presencia de un microambiente proinflamatorio durante la involución, que podría favorecer la transformación maligna de células epiteliales pretumorales iniciadas con mutaciones acumuladas (11).

Modelos animales modificados genéticamente sugieren que la intensidad y la aceleración de la involución se asocian con cambios en la susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama. Por ejemplo, una involución acelerada, como ocurre con la delección de genes como *Stat5a* o *Akt1*, se asocia con una menor susceptibilidad tumoral en modelos murinos. En contraste, una involución retrasada, observada tras la delección de genes como *Il-6* o *Stat3*, correlaciona con un mayor riesgo de desarrollo tumoral (15).

1.4. Quimioprevención del cáncer de mama

Las principales estrategias actuales de quimioprevención farmacológica frente al cáncer de mama comprenden los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs) como el tamoxifeno y el raloxifeno, e inhibidores de la aromatasa (anastrozol y exemestano) (16). Ambos disminuyen la estimulación estrogénica en la mama. Mientras que los SERMs bloquean la acción del estrógeno en la mama, los inhibidores de la aromatasa reducen la producción de estrógeno en el cuerpo.

A pesar de la alta frecuencia y potencial gravedad del cáncer de mama, las estrategias de quimioprevención actuales son escasas y están asociadas con efectos secundarios adversos significativos como tromboembolismo, sequedad bucal y vaginal, cefalea y náuseas (17). Por otra parte, las opciones de quimioprevención son escasas para ciertos subtipos agresivos de cáncer de mama, como los ER-negativos (18).

Otra estrategia de prevención del cáncer de mama es la cirugía. La mastectomía bilateral con doble ooforectomía está recomendada en mujeres con mutaciones en genes de alta susceptibilidad a desarrollar cáncer de mama como *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53* y *PTEN*. Esta intervención reduce el riesgo de desarrollar la enfermedad en un 90%, aunque conlleva importantes efectos secundarios físicos y psicológicos (19–21).

Por estas razones, es crucial desarrollar nuevas terapias de quimioprevención más efectivas y mejor toleradas frente a todos los subtipos de cáncer de mama, especialmente, frente a los más agresivos.

1.5. Papel de la vía JAK2/STAT5 durante la lactancia y la involución

La familia de proteínas STAT (del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription*) juegan un papel fundamental en el desarrollo de la glándula mamaria y la involución. En la glándula mamaria se han descrito hasta 5 proteínas de la familia STAT: STAT1, STAT3, STAT5a, STAT5b y STAT6 (22).

Aunque los genes *Stat5a* y *Stat5b* comparten un 96% de homología, sus funciones divergen claramente (23). *Stat5a* es esencial para el desarrollo mamario y la lactancia, mientras que *Stat5b* regula principalmente el crecimiento corporal, sin un papel relevante en la glándula mamaria. Esta especialización funcional se evidencia en modelos *knockout*, donde la pérdida de *Stat5a* (pero no de *Stat5b*) causa defectos severos en la formación alveolar y producción de leche (24).

Los genes *Stat3* y *Stat5* son imprescindibles para el correcto desarrollo de la glándula mamaria, pero desempeñan roles opuestos (25). Mientras que *Stat5* (especialmente *Stat5a*) es esencial para el desarrollo y diferenciación de los alveolos secretores y para la producción de leche (26), *Stat3* es el regulador principal de la involución postlactancia, induciendo apoptosis masiva y regresión tisular durante esta fase (27). Por ello, el desarrollo de la glándula mamaria depende de un balance dinámico entre STAT5a que impulsa el desarrollo y la lactancia, y STAT3 que promueve la regresión en la involución postlactancia. De este modo, durante la lactancia, STAT5a está activo (por señalización inducida por la prolactina), mientras que en la involución, STAT5a decae y STAT3 se activa (28).

La vía de señalización JAK2/STAT5a (**Figura 2**), cuya activación la produce el receptor de prolactina (PRLR), juega un papel clave en la expresión de genes relacionados con la producción de proteínas de la leche (29). Esta vía comienza con la unión de la prolactina a su receptor activando la quinasa JAK2, que fosforila a STAT5a, permitiendo su dimerización y traslocación al núcleo (30). Como resultado de la activación de la vía JAK2/STAT5a, se sintetizan diversas proteínas de la leche, como la proteína ácida del suero (WAP), la α -caseína y la β -caseína, así como otras proteínas implicadas en procesos de proliferación, diferenciación y morfogénesis.

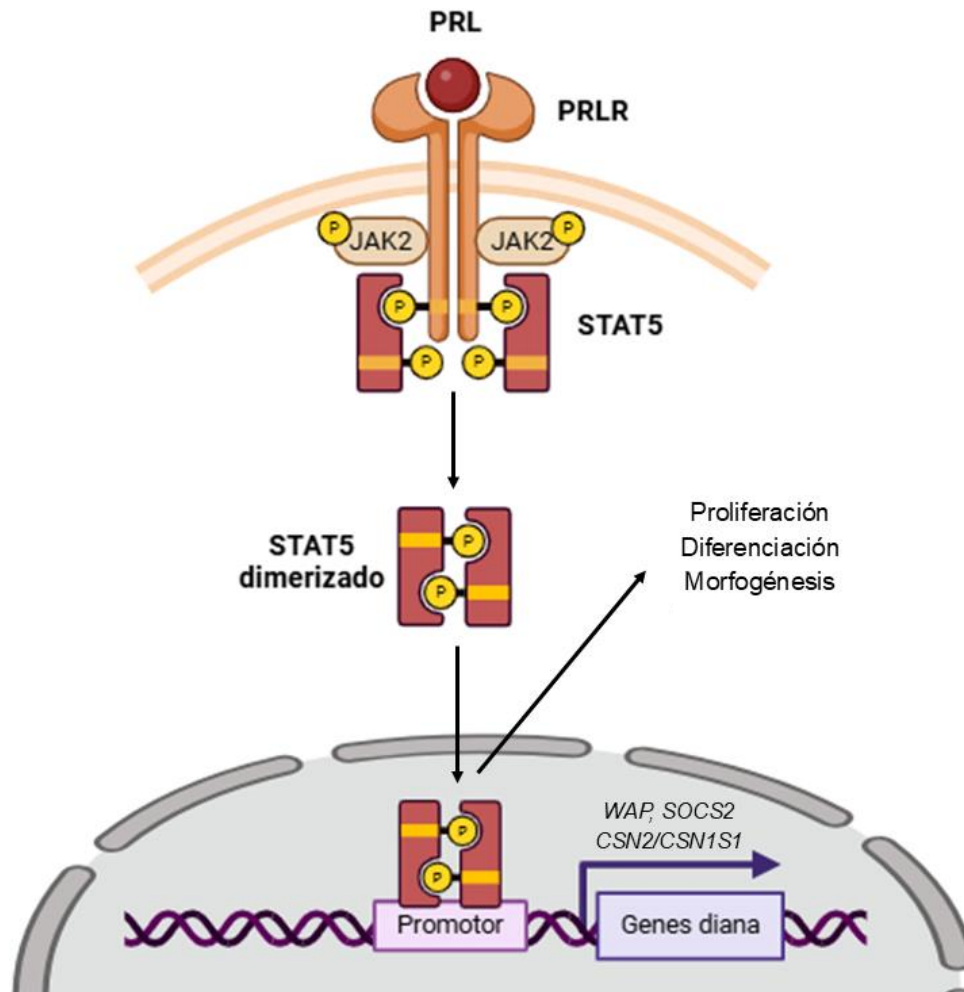


Figura 2. Representación esquemática de la vía de señalización de JAK2/STAT5a durante el período de lactancia. Figura creada con BioRender.com. Adaptada y modificada de Tian et al. (31).

2. Hipótesis y Objetivos

2.1. Antecedentes y justificación del estudio

La tesis del laboratorio previa llevada a cabo por el Dr. Alejandro Jiménez Navas muestra que el inhibidor de STAT5 (iSTAT5), nicotinoil hidrazona no peptídica, en el momento del destete produce una potenciación de la involución postlactancia. Evaluar el efecto directo del inhibidor *in vivo* sobre STAT5 es difícil por el contenido graso de las muestras (32–34), por lo que se precisan métodos alternativos.

En este estudio de TFG, se planteó profundizar en el efecto del inhibidor de STAT5 en un modelo *in vitro*, como datos previos a los que se obtendrán *in vivo*. Para ello, se evaluó su efecto sobre un modelo de involución postlactancia en una línea celular utilizada en la literatura para este fin (35–37).

2.2. Hipótesis de trabajo

Las estrategias actuales de quimioprevención frente al cáncer de mama son limitadas y conllevan efectos adversos importantes. Modelos murinos modificados genéticamente sugieren que la modificación de los niveles de STAT5 se asocia a una modificación de la involución postlactancia y a cambios en la susceptibilidad al cáncer de mama(15). Datos previos del laboratorio indican que el inhibidor de STAT5 (nicotinoil hidrazona no peptídica) potencia la involución postlactancia *in vivo*; pero, problemas técnicos han impedido evaluar el efecto directo del inhibidor sobre STAT5.

En este estudio, planteamos la **hipótesis** de que los efectos potenciadores de la involución postlactancia observados *in vivo* con el inhibidor de STAT5 pueden reproducirse *in vitro*, lo que permitiría analizar su impacto sobre los niveles totales y fosforilados de STAT5.

2.3. Objetivo general y objetivos específicos

El **objetivo general** de este trabajo es profundizar en los efectos del inhibidor nicotinoil hidrazona no peptídica sobre STAT5 en el contexto de la involución postlactancia en un modelo *in vitro*.

Los **objetivos específicos** de este trabajo son los siguientes:

- Puesta a punto y validación del efecto del inhibidor de STAT5 sobre la muerte celular en un modelo *in vitro* de involución postlactancia.
- Estudiar el efecto del inhibidor sobre los niveles de STAT5.

3. Material y métodos

3.1. Modelo *in vitro* de involución postlactancia: línea celular HC11 y condiciones de cultivo

La línea celular HC11 es una línea epitelial de mama no tumoral que procede de un ratón hembra gestante BALB/c. Es sensible a la prolactina y sufre diferenciación lactogénica al ser tratadas con un cóctel de hormonas (prolactina y dexametasona/hidro cortisona) (35). Se utilizan como modelo *in vitro* para estudiar la diferenciación lactogénica y la involución postlactancia (36).

Las células HC11 se cultivan en medio RPMI-1640 enriquecido con un 10% de suero bovino fetal, 1% de penicilina/estreptomicina (10.000 U/mL), glutamina 200 mM, 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico y 5 µg/mL de insulina. Para inducir la diferenciación lactogénica se añade un medio con 5 µg/mL de prolactina y 1 µg/mL de

hidrocortisona durante 72 horas y posteriormente, se retorna al medio inicial, de mantenimiento, para simular la involución postlactancia.

La línea celular se manejó en condiciones de esterilidad utilizando una campana de cultivo con flujo laminar. Las células se cultivaron en placas estériles de 100mm² con medio suplementado, manteniéndolas en incubadores a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda.

3.2. Inhibidor de STAT5

El inhibidor de STAT5 empleado en este estudio (*STAT5 Inhibitor, nonpeptidic nicotinoyl hydrazone, #SC355979A, Santa Cruz Biotechnology*) es un compuesto no peptídico capaz de atravesar membrana celular. Su mecanismo de acción se basa en la unión específica al dominio SH2 de STAT5 impidiendo su dimerización y activación. Esto impide que STAT5 se transloque al núcleo y regule la transcripción de genes específicos.

Preparación, conservación y concentraciones de uso

El inhibidor de STAT5 se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) para obtener alícuotas a una concentración final del fármaco de 50 mM que se conservaron a -20°C. Se ha descrito que la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) del fármaco es 47 µM en células Daudi (38), sin embargo, no está descrito en la literatura cual es la dosis letal 50 de este fármaco en la línea celular HC11. Por ello, antes de comenzar los experimentos, se evaluaron diferentes concentraciones del inhibidor en la línea celular HC11. Para los experimentos se prepararon diluciones del fármaco a las concentraciones requeridas (50, 100, 150 y 200 µM). No se evaluaron dosis superiores ya que a partir de 200 µM se han descrito que podrían existir efectos *off target* (39).

3.3. Estudio de la viabilidad celular mediante ensayo MTT

El ensayo MTT evalúa la viabilidad celular mediante la reducción del bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a formazán por la acción de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa. Inicialmente, el MTT es de color amarillo, pero al ser reducido a formazán, este precipita y adquiere un tono azul. Posteriormente, las sales de formazán se solubilizan con DMSO, permitiendo medir la absorbancia y estimar de manera indirecta la cantidad de MTT reducido por la actividad metabólica celular, lo que refleja el número de células viables en el cultivo.

Para este estudio, se sembraron 50.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos. Se añadieron las diferentes concentraciones del fármaco antes indicadas, para evaluar la dosis efectiva a partir de la cual observamos diferencias en la viabilidad celular. Además, se incluyó un control con medio sin fármaco (0 µM). Tras incubar con el inhibidor durante

24 horas, se añadieron 55 µL de MTT por pocillo, incubando 1 hora más. Las sales de formazán se solubilizaron con 500 µL de DMSO. La absorbancia se midió a 570 nm (para detectar la señal de formazán) y a 630 nm (para la señal de fondo) en un lector de placas *Tecan Infinite M200 Pro*.

3.4. Extracción de RNA y estudio de la expresión génica mediante RT-qPCR

La extracción de RNA se llevó a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante del kit *RNeasy Mini Kit* (#74104, *Qiagen*), que se basa en la extracción de fenol y cloroformo, unido a la unión selectiva del RNA a una membrana de gel de sílice en presencia de un tampón con guanidina y etanol para la extracción y purificación del RNA. Una vez extraídas las muestras de RNA, se evaluó la concentración y pureza del RNA a unas longitudes de onda de 230, 260 y 280 nm mediante un *Nanodrop ND-1000*.

Para la realización de la RT-qPCR se empleó el kit *RevertAid RT Kit* (#K1691, *Thermoscientific*) para generar cDNA (DNA complementario sintetizado a partir de mRNA mediante la enzima transcriptasa inversa) y se amplificó utilizando un sistema denominado *SYBR Green* de PCR en tiempo real (#95055-500, *SYBR Green SuperMix, ROX*). El *SYBR Green* es un fluoróforo que se une de manera específica al surco menor del DNA de doble cadena que emite fluorescencia, lo que permite cuantificar la cantidad de DNA presente. Durante la PCR, esta señal fluorescente se irá incrementando de manera exponencial, pero de forma proporcional a la cantidad inicial de DNA. Las secuencias de los cebadores se enumeran en la **Tabla 1**.

La reacción q-PCR y posterior lectura se realizó en el termociclador *Mastercycler ep RealPlex2* (*Eppendorf*). El programa de ciclos de temperatura consistió en: (i) una desnaturalización inicial durante 10 minutos a 95°C; (ii) 40 ciclos formados de tres pasos: desnaturalización a 95°C durante 15 segundos, anillamiento a 58°C durante 30 segundos, y amplificación a 72°C durante 30 segundos. Se llevó a cabo una medición de la fluorescencia emitida por el fluoróforo al final de cada ciclo durante esta fase.

La expresión relativa del RNA se calculó mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, que es una técnica empleada para determinar la expresión relativa de un gen en muestras experimentales en comparación con un control. Este método compara las diferencias en los ciclos umbral (C_t) entre las muestras y el control para cuantificar las variaciones en la expresión génica. La expresión del gen *housekeeping Gapdh* se utilizó como control.

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados para la realización de la RT-qPCR.

Gen	Cebador	Secuencia (5'-3')	Longitud (pb)	Tm (°C)
<i>Stat5a</i>	<i>Stat5a</i> Fw	5'-CGCCAGATGCAAGTGTGTAT-3'	21	61.0
<i>Stat5a</i>	<i>Stat5a</i> Rv	5'-TCCTGGGGATTATCCAAGTCAAT-3'	23	60.6
<i>Stat5b</i>	<i>Stat5b</i> Fw	5'-CGATGCCCTTACCAGATG-3'	19	60.2
<i>Stat5b</i>	<i>Stat5b</i> Rv	5'-AGCTGGGTGGCCTTAATGTTC-3'	21	62.4
<i>Gapdh</i>	<i>Gapdh</i> Fw	5'-CTGCACCACCAACTGCTTAG-3'	20	64.1
<i>Gapdh</i>	<i>Gapdh</i> Rv	5'-GTCTTCTGGGTGGCAGTGAT-3'	20	65.0

3.5. Lisis celular, extracción de proteínas y western blot

Las células se cultivaron en placas de 60mm con una densidad de $3.3 \cdot 10^6$ células/placa. Para la extracción de proteínas, se preparó el buffer de lisis RIPA compuesto por Tris 50mM, EDTA 5mM, NaCl 150mM, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS, 0.5% deoxicolato sódico y agua. A este, se añadieron inhibidores de fosfatasa, inhibidores de proteasas y PMSF (10 µg/µL).

Se lavaron con PBS 1X Na⁺ y se despegaron de la placa mediante la incubación durante 5-10 minutos a 37°C con 1 mL de TrypLE (*TrypLE™ Express, #12604-013, Gibco*). Posteriormente, se resuspendieron en medio de cultivo fresco y centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos. El pellet celular se resuspendió en 350 µL de buffer RIPA y se incubó en hielo, 30 minutos. La suspensión obtenida se centrifugó a 4°C, 10 minutos a >12.000 rpm y el sobrenadante, que contenía el lisado proteico, se transfirió a un nuevo tubo. La concentración final de proteínas se determinó mediante ensayo BCA (ácido bicinonínico). El ensayo BCA se fundamenta en la reacción de Biuret, en la que los iones Cu²⁺ se reducen a Cu⁺ por efecto de los enlaces peptídicos presentes en las proteínas. Posteriormente, los iones Cu⁺ reaccionan con el ácido bicinonínico formando un complejo de color púrpura cuya absorbancia se correlaciona directamente con la concentración de proteínas en la muestra. Para determinar la concentración, se midió la absorbancia a 570 nm de longitud de onda en el lector de *placas Ultra-Evolution TECAN*. Finalmente, se calculó la concentración de proteínas de las muestras utilizando una recta patrón de concentraciones conocidas de albúmina.

Para la realización del western blot, se separaron 35 µg de proteínas totales mediante SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida con Dodecil Sulfato de Sodio) al 12% y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (*Schleicher & Schuell*). La carga se verificó mediante tinción con Ponceau S (*Sigma-Aldrich*). La membrana se bloqueó en TTBS (*Tween-Tris-buffered saline*) con 5% de leche desnatada a 4 °C, durante 1 hora

y se incubó con el anticuerpo primario diluido en el mismo tampón toda la noche a 4 °C. Tras tres lavados con TTBS, se incubó con el anticuerpo secundario conjugado con HRP (IgG anti-conejo o anti-ratón, 1:3000). La detección se realizó mediante quimioluminiscencia con ECL Plus (*Thermo Fisher Scientific, MA, USA*). El revelado se llevó a cabo en el sistema de adquisición de imágenes *iBright™ FL1500*.

Tabla 2. Lista de anticuerpos utilizados en el western blot.

Anticuerpo	Especie	Dilución	Casa comercial	Referencia
STAT5	Ratón	1:1000	Cell Signaling	#94205
P-STAT5 (Y694)	Ratón	1:1000	Cell Signaling	#9351
Caspasa 3	Ratón	1:1000	Cell Signaling	#9662
Caspasa-3 escindida	Conejo	1:2000	Cell Signaling	#9661
GAPDH	Conejo	1:3500	Invitrogen	#TAB1001
Anti-conejo HRP	Cabra	1:10000	Jackson ImmunoResearch	#111-035-144
Anti-ratón HRP	Cabra	1:10000	Jackson ImmunoResearch	#115-035-003

3.6. Evaluación de la degradación proteica mediante ensayo con cicloheximida

La cicloheximida es un inhibidor que inhibe la síntesis de proteínas y permite medir la cinética de su degradación.

Para el tratamiento con cicloheximida, se mantuvieron las células en cultivo hasta alcanzar una confluencia celular aproximada del 80%. Las células de ambas condiciones (control y tratadas con 150 μ M del iSTAT5) fueron tratadas con 50 μ g/mL de cicloheximida y se obtuvieron lisados celulares a diferentes tiempos (1, 2, 6 y 12 horas). El lisado, la determinación de la concentración final de proteínas y el western blot se realizaron según lo descrito en el apartado 5 de esta sección de Material y Métodos.

3.7. Análisis estadístico de los datos

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa informático *GraphPad Prism 9*. Se realizó el test de Shapiro-Wilk ($n < 40$) para evaluar la distribución estadística de los datos y determinar su normalidad. Se utilizó el test paramétrico *t de Student* para determinar la significación estadística de las diferencias entre grupos, puesto que las variables se ajustaron a una distribución normal. Cuando la comparación se realizó entre más de dos grupos, se realizó un ANOVA unidireccional seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. La significación estadística se fijó $p < 0,05$.

4. Resultados

4.1. El inhibidor de STAT5 disminuye la viabilidad celular potenciando la muerte celular por apoptosis

Se llevó a cabo la diferenciación lactogénica de las células HC11. Después, se evaluó, mediante ensayos de MTT, el efecto sobre la viabilidad celular del inhibidor de STAT5 en las células HC11 tras retirar el medio de diferenciación y añadir el de mantenimiento (HC11 involucionada). Se realizó el estudio a 24 horas con concentraciones del inhibidor de STAT5 de 50 μ M, 100 μ M, 150 μ M y 200 μ M. Se observó una disminución dosis-dependiente estadísticamente significativa de la viabilidad celular respecto del grupo control a 100 μ M ($p < 0.0001$), 150 μ M ($p < 0.0001$) y 200 μ M ($p < 0.0001$) (**Figura 3A**).

A partir de aquí se utilizó la concentración 150 μ M del inhibidor de STAT5 para realizar los experimentos del estudio al observar una disminución estadísticamente significativa de la viabilidad celular y no superar la concentración a partir de la cual se han descrito que podría haber efectos *off target* (39).

Así, posteriormente, se evaluó si la pérdida de la viabilidad celular se relacionaba con un aumento de la muerte por apoptosis. Por ello, se comprobó la expresión proteica mediante western blot de la caspasa-3 escindida o activa, proteína proapoptótica cuyos niveles correlacionan con el grado de apoptosis (40,41).

Así, se observó que el tratamiento con el inhibidor de STAT5 a una concentración de 150 μ M produjo un aumento de la expresión de caspasa-3 activa (**Figura 3B**).

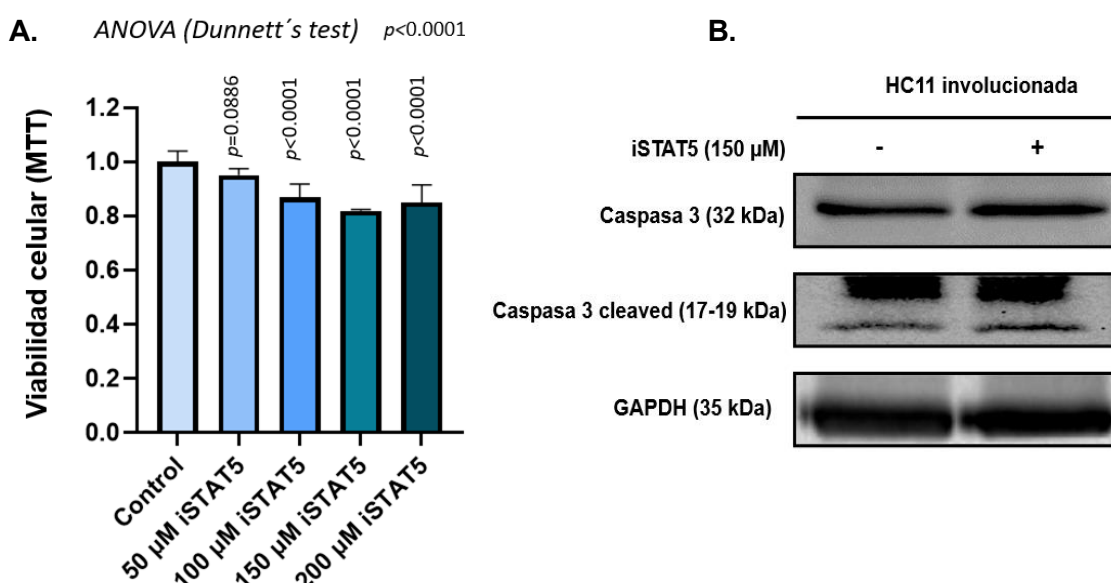


Figura 3. Evaluación del efecto del inhibidor de STAT5 a diferentes concentraciones sobre la viabilidad celular y determinación de la dosis efectiva. A) Mediante ensayos MTT se

evaluó el efecto sobre la viabilidad de diferentes concentraciones del fármaco a 24 horas. Cada condición se evaluó por triplicado (N=3) **B)** HC11 involucionada corresponde a la línea celular HC11 a la cual se le ha inducido la involución postlactancia al retirarle el cóctel hormonal. Se evaluó mediante western blot la caspasa-3 activa. Los lisados celulares se recogieron a las 24 horas. Se utilizaron 35 µg de proteína por muestra y se empleó GAPDH como control de carga.

4.2. Evaluación del efecto del inhibidor de STAT5 (iSTAT5) sobre la expresión génica y proteica de STAT5

Posteriormente, evaluamos el efecto del inhibidor de STAT5 a la concentración de 150µM sobre la expresión de STAT5 y p-STAT5 mediante western blot. Se observó una disminución de la cantidad de p-STAT5, y un aumento en la cantidad de STAT5 total, que podría reflejar un efecto compensador al disminuir la proteína fosforilada (**Figura 4A**).

Para determinar el nivel al que tenía lugar el posible efecto compensador del aumento de la proteína STAT5 total, se llevó a cabo una RT-qPCR para evaluar los niveles de mRNA de STAT5. Por otra parte, como el anticuerpo utilizado frente a STAT5 total y fosforilado reconoce las dos isoformas de STAT5, se determinaron los niveles de RNA de ambos genes Stat5a y Stat5b, puesto que, debido a su elevada homología de las proteínas, el inhibidor podría estar afectando a ambas isoformas. Sin embargo, paradójicamente, se observó una disminución paradójica de los niveles de mRNA de las células tratadas con respecto al control, tanto de Stat5a como de Stat5b. Este resultado indica, por lo tanto, que el aumento de STAT5 observado a nivel proteico no es consecuencia de un aumento a nivel transcripcional de la expresión génica como posible mecanismo compensatorio (**Figura 4B**).

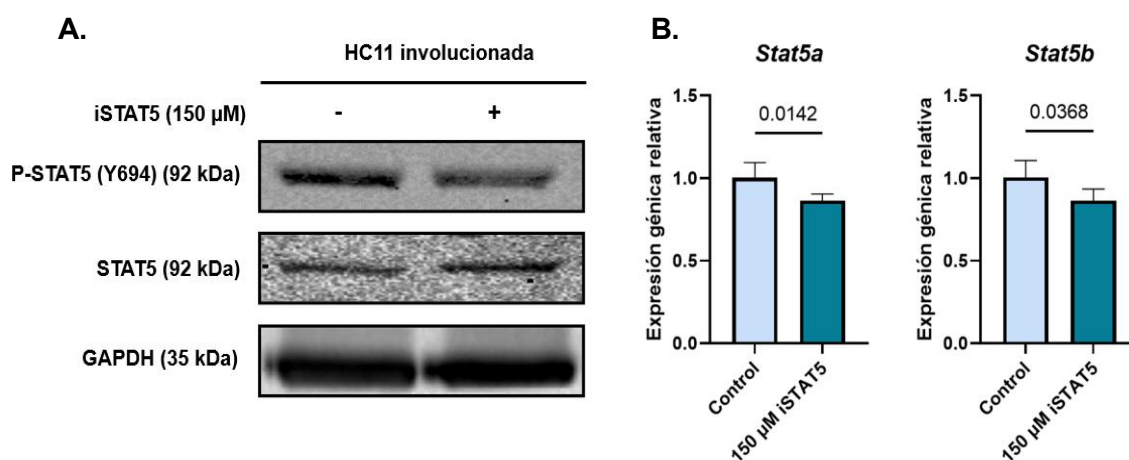


Figura 4. Evaluación del efecto del inhibidor de STAT5 sobre la expresión proteica y de la expresión génica. A) Western blot que muestra la expresión de STAT5 total y p-STAT5 tras la

acción de inhibidor de STAT5. Los lisados celulares se recogieron a las 24 horas. Se utilizaron 35 µg de proteína por muestra y se empleó la GAPDH como control de carga. **B)** Cuantificación de la expresión de Stat5a y Stat5b mediante RT-qPCR.

4.3. Estabilización de los niveles de STAT5 total en presencia del inhibidor

A continuación, para investigar si el aumento de los niveles totales de proteína STAT5 tras el tratamiento con el inhibidor se debía a una reducción en su degradación, se llevó a cabo un ensayo de estabilidad proteica mediante tratamiento con cicloheximida, que bloquea la síntesis de proteínas. Este enfoque permite monitorizar la degradación de STAT5 en ausencia de síntesis *de novo*.

En el grupo control, como era de esperar tras la inhibición de la síntesis proteica por cicloheximida, se observó una disminución progresiva de los niveles de STAT5 total a lo largo del tiempo, reflejando su degradación normal. En cambio, en presencia del inhibidor, los niveles de STAT5 se mantuvieron e incluso aumentaron, lo que indica una estabilización postraduccional de la proteína (**Figura 5**). Estos resultados sugieren que el efecto compensador inducido por el inhibidor tiene lugar a nivel postranscripcional, mediante una reducción en la degradación de STAT5.

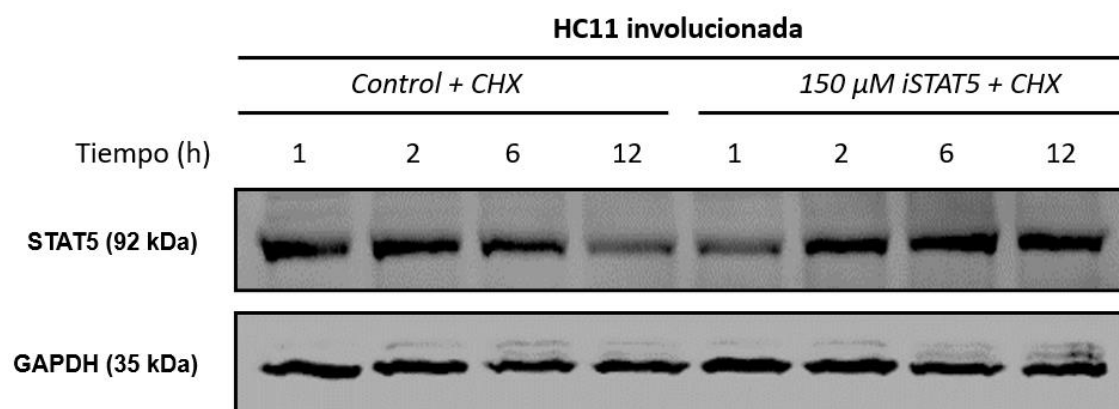


Figura 5. Evaluación de la degradación proteica de STAT5 en presencia del inhibidor de STAT5 (150 µM). Se evaluó mediante un ensayo con cicloheximida los niveles de STAT5. Los lisados de las células HC11 control y tratadas se recogieron a diferentes tiempos (1, 2, 6 y 12 horas). Para la determinación semicuantitativa de la cantidad proteica se llevó a cabo un western blot en el que se utilizaron 35 µg de proteína por muestra y se empleó la GAPDH como control de carga.

5. Discusión

La búsqueda de estrategias de quimioprevención para el cáncer de mama es prioritaria (16,42–44). Datos previos de nuestro laboratorio *in vivo* ya indicaban que la inhibición de STAT5 potencia la involución postlactancia, un proceso cuya modulación puede influir en la susceptibilidad al cáncer (*tesis del Dr. Jiménez Navas*)(45,46). La involución mamaria postlactancia es un periodo de intensa remodelación tisular, podría ser una 'ventana de susceptibilidad' para el desarrollo del cáncer de mama, especialmente si este proceso es incompleto o se retrasa. La vía JAK/STAT5, fundamental para mantener la lactancia y la supervivencia de las células epiteliales mamarias secretoras, se desactiva fisiológicamente para permitir la apoptosis y la involución (47). Nuestros hallazgos, demostrando que la inhibición farmacológica de STAT5 acelera la pérdida de viabilidad y la apoptosis en un modelo *in vitro* de involución, refuerzan la hipótesis de que la persistencia de la señalización de STAT5 podría contribuir a un ambiente pro-tumoral durante la involución. Por tanto, dirigirse a STAT5 podría ser particularmente relevante para mitigar el riesgo de cáncer de mama asociado al postparto, un subtipo de cáncer con frecuencia agresivo (48). Sin embargo, la evaluación directa del efecto del inhibidor sobre la proteína STAT5 *in vivo* durante la involución se ve dificultada por artefactos técnicos, como la interferencia de la grasa láctea en los análisis de western blot (32–34). Por ello, este trabajo se centró en un modelo *in vitro* para (i) validar que el inhibidor potencia la muerte celular en un sistema de involución establecido y (ii) elucidar su impacto directo sobre los niveles y actividad de STAT5, superando las limitaciones del análisis *in vivo*.

Nuestros resultados *in vitro* confirman que el inhibidor de STAT5 (iSTAT5) disminuye la viabilidad celular e induce apoptosis en células mamarias HC11 sometidas a involución (**Figura 3**), lo que concuerda con los efectos observados *in vivo* y valida el sistema como herramienta para estudiar los mecanismos moleculares.

Crucialmente, el análisis proteico *in vitro* reveló una clara disminución de p-STAT5 (forma activa) tras el tratamiento (**Figura 4A**), confirmando la acción del inhibidor sobre la vía JAK2/STAT5, esencial para la involución (26,28). Detectamos también un incremento paradójico en los niveles de STAT5 total, que no se debió a un aumento transcripcional (**Figura 4B**). Experimentos con cicloheximida demostraron que el iSTAT5 induce una estabilización postraduccional de la proteína STAT5 total (**Figura 5**). Este hallazgo, difícil de obtener con precisión *in vivo*, sugiere que la célula acumula STAT5 inactiva en respuesta al inhibidor, sin que esto impida la progresión de la apoptosis inducida por la falta de p-STAT5.

Por lo tanto, este estudio *in vitro* no solo corrobora los efectos pro-involutivos del iSTAT5 observados *in vivo*, sino que también proporciona una explicación mecanicista a nivel proteico para su acción, difícil de diseccionar en el modelo animal. El iSTAT5 potencia la involución disminuyendo la forma activa p-STAT5 e induciendo apoptosis, mientras que la proteína STAT5 total acumulada permanece inactiva.

Una **limitación** inherente a este estudio *in vitro* es que, aunque útil para el análisis molecular detallado, la línea celular HC11 no recapitula toda la complejidad del tejido mamario. Como perspectiva futura, sería valioso complementar estos hallazgos utilizando modelos *in vitro* más avanzados, como organoides derivados de tejido mamario, que podrían ofrecer un puente entre la simplicidad de los cultivos 2D y la complejidad del tejido *in vivo*, permitiendo estudiar la respuesta al inhibidor en un contexto celular más fisiológico. Además, aunque ya tenemos datos *in vivo* sobre el efecto fenotípico, sería interesante intentar optimizar los protocolos de extracción proteica del tejido mamario en involución para confirmar si esta estabilización de STAT5 total también ocurre *in vivo*, o explorar otros marcadores indirectos de este fenómeno.

En conclusión, este trabajo *in vitro* valida el efecto pro-apoptótico del inhibidor de STAT5 en un modelo de involución y, fundamentalmente, elucida su impacto sobre la dinámica de la proteína STAT5, demostrando una reducción de su forma activa y una estabilización de su forma total inactiva. Estos hallazgos complementan y explican observaciones previas *in vivo*, reforzando el potencial del iSTAT5 como agente quimiopreventivo.

6. Conclusiones

1. El inhibidor de STAT5 (iSTAT5, 150 μ M) potencia la involución postlactancia in vitro en células HC11, reduciendo la viabilidad celular e induciendo apoptosis, en línea con datos previos in vivo.
2. El iSTAT5 disminuye eficazmente los niveles de p-STAT5, confirmando su acción sobre la vía de señalización.
3. A pesar de reducir Stat5a/b a nivel de mRNA, el tratamiento estabiliza la proteína STAT5 total no fosforilada, evitando su degradación.

Conclusions

1. *STAT5 inhibitor (iSTAT5, 150 μ M) promotes postlactational involution in vitro in HC11 cells, reducing cell viability and inducing apoptosis, in line with previous in vivo data.*
2. *iSTAT5 effectively decreases p-STAT5 levels, confirming its action on the signalling pathway.*
3. *Despite reducing Stat5a/b at the mRNA level, the treatment stabilises total non-phosphorylated STAT5 protein, preventing its degradation.*

7. Bibliografía

1. DeSantis CE, Fedewa SA, Goding Sauer A, Kramer JL, Smith RA, Jemal A. Breast cancer statistics, 2015: Convergence of incidence rates between black and white women. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):31–42.
2. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(3):229–63.
3. Giaquinto AN, Sung H, Newman LA, Freedman RA, Smith RA, Star J, et al. Breast cancer statistics 2024. *CA Cancer J Clin.* 2024;74(6):477–95.
4. Popa MT, Noditi A, Peleaşa TM, Stoleru S, Blidaru A. Breast Cancer: A Heterogeneous Pathology. Prognostic and Predictive Factors - A Narrative Review. *Chirurgia (Bucur).* 2025;120(1):32.
5. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci.* 2017 Nov 1;13(11):1387–97.
6. Calero Cuerda F. Factores de riesgo en el cáncer de mama. *Prog Obstet Ginecol.* 1999 May 1;42(90):9065–88.
7. MacMahon B, Cole P, Lin TM, Lowe CR, Mirra AP, Ravnihar B, et al. Age at first birth and breast cancer risk. *Bull World Health Organ.* 1970;43(2):209–21.
8. Meier-Abt F, Bentires-Alj M. How pregnancy at early age protects against breast cancer. *Trends Mol Med.* 2014 Mar 1;20(3):143–53.
9. Albrektsen G, Heuch I, Hansen S, Kvåle G. Breast cancer risk by age at birth, time since birth and time intervals between births: exploring interaction effects. *Br J Cancer.* 2005 Jan 17;92(1):167–75.
10. Lambe M, Hsieh C cheng, Trichopoulos D, Ekbom A, Pavia M, Adami HO. Transient Increase in the Risk of Breast Cancer after Giving Birth. *N Engl J Med.* 1994 Jul 7;331(1):5–9.
11. Schedin P. Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nat Rev Cancer.* 2006 Apr;6(4):281–91.
12. Husby A, Wohlfahrt J, Øyen N, Melbye M. Pregnancy duration and breast cancer risk. *Nat Commun.* 2018 Oct 23;9(1):4255.
13. Breastfeeding and the prevention of breast cancer: a retrospective review of clinical histories - González-Jiménez - 2014 - Journal of Clinical Nursing - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2025 Mar 20]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jocn.12368>

14. Watson CJ. Key stages in mammary gland development - Involution: apoptosis and tissue remodelling that convert the mammary gland from milk factory to a quiescent organ. *Breast Cancer Res.* 2006;8(2):203.
15. Radisky DC, Hartmann LC. Mammary Involution and Breast Cancer Risk: Transgenic Models and Clinical Studies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2009 Jun 1;14(2):181–91.
16. Pruthi S, Heisey RE, Bevers TB. Chemoprevention for Breast Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2015;22(10):3230–5.
17. Ball S, Arevalo M, Juarez E, Payne JD, Jones C. Breast cancer chemoprevention: An update on current practice and opportunities for primary care physicians. *Prev Med.* 2019 Dec 1;129:105834.
18. Garrido-Castro AC, Lin NU, Polyak K. Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. *Cancer Discov.* 2019 Feb 8;9(2):176–98.
19. Schrauder MG, Brunel-Geuder L, Häberle L, Wunderle M, Hoyer J, Reis A, et al. Cost-effectiveness of risk-reducing surgeries in preventing hereditary breast and ovarian cancer. *The Breast.* 2017 Apr 1;32:186–91.
20. Rebbeck TR, Friebel T, Lynch HT, Neuhausen SL, van 't Veer L, Garber JE, et al. Bilateral Prophylactic Mastectomy Reduces Breast Cancer Risk in BRCA1 and BRCA2 Mutation Carriers: The PROSE Study Group. *J Clin Oncol.* 2004 Mar 15;22(6):1055–62.
21. Meijers-Heijboer H, Geel B van, Putten WLJ van, Henzen-Logmans SC, Seynaeve C, Menke-Pluymers MBE, et al. Breast Cancer after Prophylactic Bilateral Mastectomy in Women with a BRCA1 or BRCA2 Mutation. *N Engl J Med.* 2001 Jul 19;345(3):159–64.
22. Hughes K, Watson CJ. The spectrum of STAT functions in mammary gland development. *JAK-STAT.* 2012 Jul 1;1(3):151–8.
23. Rani A, Murphy JJ. STAT5 in Cancer and Immunity. *J Interferon Cytokine Res.* 2016 Apr;36(4):226–37.
24. Cui Y, Riedlinger ,Greg, Miyoshi ,Keiko, Tang ,Wei, Li ,Cuiling, Deng ,Chu-Xia, et al. Inactivation of Stat5 in Mouse Mammary Epithelium during Pregnancy Reveals Distinct Functions in Cell Proliferation, Survival, and Differentiation. *Mol Cell Biol.* 2004 Sep 1;24(18):8037–47.
25. Clarkson RWE, Boland MP, Kritikou EA, Lee JM, Freeman TC, Tiffen PG, et al. The Genes Induced by Signal Transducer and Activators of Transcription (STAT)3 and STAT5 in Mammary Epithelial Cells Define the Roles of these STATs in Mammary Development. *Mol Endocrinol.* 2006 Mar 1;20(3):675–85.
26. Vafaizadeh V, Klemmt P, Brendel C, Weber K, Doebele C, Britt K, et al. Mammary Epithelial Reconstitution with Gene-Modified Stem Cells Assigns Roles to Stat5 in Luminal

Alveolar Cell Fate Decisions, Differentiation, Involution, and Mammary Tumor Formation. *Stem Cells*. 2010 May 1;28(5):928–38.

27. Chapman RS, Lourenco P, Tonner E, Flint D, Selbert S, Takeda K, et al. The Role of Stat3 in Apoptosis and Mammary Gland Involution. In: Mol JA, Clegg RA, editors. *Biology of the Mammary Gland* [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2002 [cited 2025 Apr 2]. p. 129–38. Available from: https://doi.org/10.1007/0-306-46832-8_16
28. Watson CJ, Neoh K. The Stat family of transcription factors have diverse roles in mammary gland development. *Semin Cell Dev Biol*. 2008 Aug 1;19(4):401–6.
29. Sinha S, Sharma S, Vora J, Shah H, Srivastava A, Shrivastava N. *Mucuna pruriens* (L.) DC chemo sensitize human breast cancer cells via downregulation of prolactin-mediated JAK2/STAT5A signaling. *J Ethnopharmacol*. 2018 May 10;217:23–35.
30. Neilson LM, Zhu J, Xie J, Malabarba MG, Sakamoto K, Wagner KU, et al. Coactivation of Janus Tyrosine Kinase (Jak)1 Positively Modulates Prolactin-Jak2 Signaling in Breast Cancer: Recruitment of ERK and Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat)3 and Enhancement of Akt and Stat5a/b Pathways. *Mol Endocrinol*. 2007 Sep 1;21(9):2218–32.
31. Tian M, Qi Y, Zhang X, Wu Z, Chen J, Chen F, et al. Regulation of the JAK2-STAT5 Pathway by Signaling Molecules in the Mammary Gland. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Nov 17;8:604896.
32. Taylor SC, Posch A. The Design of a Quantitative Western Blot Experiment. *BioMed Res Int*. 2014;2014:361590.
33. Diaz Marin R, Crespo-Garcia S, Wilson AM, Sapieha P. RELi protocol: Optimization for protein extraction from white, brown and beige adipose tissues. *MethodsX*. 2019 Apr 18;6:918–28.
34. Morton RE, Evans TA. Modification of the bicinchoninic acid protein assay to eliminate lipid interference in determining lipoprotein protein content. *Anal Biochem*. 1992 Aug 1;204(2):332–4.
35. Ball RK, Friis RR, Schoenenberger CA, Doppler W, Groner B. Prolactin regulation of beta-casein gene expression and of a cytosolic 120-kd protein in a cloned mouse mammary epithelial cell line. *EMBO J*. 1988 Jul;7(7):2089–95.
36. Castillo-Lluva S, Hontecillas-Prieto L, Blanco-Gómez A, Sáez-Freire M del M, García-Cenador B, García-Criado J, et al. A new role of SNAI2 in post-lactational involution of the mammary gland links it to luminal breast cancer development. *Oncogene*. 2015 Sep 3;34(36):4777–90.
37. Quaglini A, Salierno M, Pellegrotti J, Rubinstein N, Kordon EC. Mechanical strain induces involution-associated events in mammary epithelial cells. *BMC Cell Biol*. 2009 Jul 17;10:55.

38. Müller J, Sperl B, Reindl W, Kiessling A, Berg T. Discovery of Chromone-Based Inhibitors of the Transcription Factor STAT5. *ChemBioChem*. 2008;9(5):723–7.
39. Schauwecker SM, Kim JJ, Licht JD, Clevenger CV. Histone H1 and Chromosomal Protein HMGN2 Regulate Prolactin-induced STAT5 Transcription Factor Recruitment and Function in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem*. 2017 Feb 10;292(6):2237–54.
40. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999 Feb;6(2):99–104.
41. Zhra M, Qasem RJ, Aldossari F, Saleem R, Aljada A. A Comprehensive Exploration of Caspase Detection Methods: From Classical Approaches to Cutting-Edge Innovations. *Int J Mol Sci*. 2024 May 17;25(10):5460.
42. Veronesi U, Boyle P, Goldhirsch A, Orecchia R, Viale G. Breast cancer. *Lancet Lond Engl*. 2005 May 14;365(9472):1727–41.
43. Olver IN. Prevention of breast cancer. *Med J Aust*. 2016 Nov 21;205(10):475–9.
44. Gabriel EM, Jatoi I. Breast cancer chemoprevention. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2012 Feb;12(2):223–8.
45. Jiménez-Navas A. Interferencia en las vías de señalización de la involución postlactancia como estrategia quimiopreventiva contra el cáncer de mama. [Salamanca]: Universidad de Salamanca; 2024.
46. García-Sancha N, Corchado-Cobos R, Blanco-Gómez A, Cunillera Puértolas O, Marzo-Castillejo M, Castillo-Lluva S, et al. Cabergoline as a Novel Strategy for Post-Pregnancy Breast Cancer Prevention in Mice and Human. *Res Sq*. 2024 Feb 5;rs.3.rs-3854490.
47. Lin M, Ku AT, Dong J, Yue F, Jiang W, Ibrahim AA, et al. STAT5 confers lactogenic properties in breast tumorigenesis and restricts metastatic potential. *Oncogene*. 2022 Nov;41(48):5214–22.
48. Haricharan S, Dong J, Hein S, Reddy JP, Du Z, Toneff M, et al. Mechanism and preclinical prevention of increased breast cancer risk caused by pregnancy. *eLife*. 2013 Dec 31;2:e00996.