



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

INTERACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS
TAMOXIFENO Y 4-HIDROXITAMOXIFENO CON MEMBRANAS
FOSFOLIPÍDICAS

D.^a Julia Ortiz Martínez
2023



UNIVERSIDAD DE MURCIA
ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
TESIS DOCTORAL

INTERACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS
TAMOXIFENO Y 4-HIDROXITAMOXIFENO CON MEMBRANAS
FOSFOLIPÍDICAS

Autor: D.^a Julia Ortiz Martínez

Director: D. Antonio Ortiz López



DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD
DE LA TESIS PRESENTADA EN MODALIDAD DE COMPENDIO O ARTÍCULOS PARA
OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR

Aprobado por la Comisión General de Doctorado el 19-10-2022

D./Dña. Julia Ortiz Martínez

doctorando del Programa de Doctorado en

Biología Molecular y Biotecnología

de la Escuela Internacional de Doctorado de la Universidad Murcia, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y titulada:

INTERACCIÓN DE LOS FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS TAMOXIFENO Y
4-HIDROXITAMOXIFENO CON MEMBRANAS FOSFOLIPÍDICAS

y dirigida por,

D./Dña. Antonio Ortiz López

D./Dña.

D./Dña.

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Además, al haber sido autorizada como compendio de publicaciones o, tal y como prevé el artículo 29.8 del reglamento, cuenta con:

- *La aceptación por escrito de los coautores de las publicaciones de que el doctorando las presente como parte de la tesis.*
- *En su caso, la renuncia por escrito de los coautores no doctores de dichos trabajos a presentarlos como parte de otras tesis doctorales en la Universidad de Murcia o en cualquier otra universidad.*

Del mismo modo, asumo ante la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada, en caso de plagio, de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Murcia, a 30 de Marzo de 2023

JULIA ORTIZ
MARTINEZ /
num:3615

Trasado digitalmente por
JULIA ORTIZ MARTINEZ /
num:3615
Fecha: 2023.03.27 14:51:52
+0200

Fdo.: Julia Ortiz Martínez

A MIS PADRES

Agradecimientos

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al director de esta tesis doctoral, Dr. Antonio Ortiz López, por la dirección, dedicación, motivación y apoyo brindado. Por sus consejos, por su amor y su cariño. Gracias por enseñarme todo lo aprendido, no solo durante esta etapa, sino durante estos veintisiete años. Gracias de nuevo por haber hecho posible esta experiencia y por trabajar tan duro, nada de esto habría sido posible sin ti. Te quiero papá.

Asimismo agradezco a mis compañeros del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Veterinaria su apoyo, especialmente Paulo y Alexandra, con quienes he compartido momentos, laboratorios y esta gran experiencia. Mi más sincera gratitud al Dr. José Neptuno Rodríguez López y la Dra. María Fernanda Montenegro Arce por haber sido parte del proceso en sus inicios. Por brindarme la oportunidad de aprender de ellos y compartir sus conocimientos conmigo, mi agradecimiento a los profesores Dr. Francisco Aranda Martínez y Dr. José Antonio Teruel Puche.

Gracias a mi madre, por estar a mi lado. Siempre serás para mí el mayor ejemplo de superación y constancia. Gracias por creer en mí. A mi hermano, por ser un referente para mí, por estar siempre disponible y sacarme de mil apuros.

A mi familia, en particular a mi abuela Pura por tener siempre una palabra de afecto. También mis agradecimientos a los que ya no están pero significaron y significan tanto aún.

A Antonio, por compartir su vida conmigo y, sobre todo, por su infinita paciencia. Y por último, quisiera dar las gracias a mis amigas Juana y Gemma por hacerme los días más amenos.

A todos, muchas gracias.

PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL

La presente tesis doctoral titulada "Interacción de los fármacos antineoplásicos tamoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno con membranas fosfolipídicas", se presenta como compendio de tres publicaciones científicas, con el visto bueno del director del trabajo y de la Comisión Académica del programa de doctorado de Biología Molecular y Biotecnología. Las referencias de las citadas publicaciones, que se muestran más adelante, son las siguientes:

Publicación 1

Título: Dissimilar action of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen on phosphatidylcholine model membranes

Autores: Julia Ortiz, Francisco J. Aranda, José A. Teruel, Antonio Ortiz

Referencia: *Biophysical Chemistry* 278 (2021) 106681

URL: <https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106681>

Publicación 2

Título: Anticancer drugs tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen as effectors of phosphatidylethanolamine lipid polymorphism

Autores: Julia Ortiz, José A. Teruel, Francisco J. Aranda, Antonio Ortiz

Referencia: *Chemistry and Physics of Lipids* 248 (2022) 105239

URL: <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2022.105239>

Publicación 3

Título: On the mechanism of membrane permeabilization by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen

Autores: Julia Ortiz, José A. Teruel, Francisco J. Aranda, Antonio Ortiz

Referencia: *Membranes* 13 (2023) 292

URL: <https://doi.org/10.3390/membranes13030292>

ABREVIATURAS

CF (5,(6)-Carboxifluoresceína)

DEPE (1,2-Dielaidil-*sn*-glicero-3-fosfocolina)

DMPC (1,2-Dimiristil-*sn*-glicero-3-fosfocolina)

DPPC (1,2-Dipalmitil-*sn*-glicero-3-fosfocolina)

DPPE (1,2-Dipalmitil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina)

DSC (Calorimetría diferencial de barrido)

DSPC (1,2-Diestearil-*sn*-glicero-3-fosfocolina)

ER (Receptor de estrógenos)

FTIR (Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier)

HTMX (4-Hidroxitamoxifeno)

LUV (Vesículas unilamelares grandes)

MD (Dinámica molecular)

MLV (Vesículas multilamelares)

PC (Fosfatidilcolina)

PE (Fosfatidiletanolamina)

PG (Fosfatidilglicerol)

POPC (1-Palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfocolina)

POPE (1-Palmitil-2-oleil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina)

SAXS (Difracción de rayos X de ángulo estrecho)

TMX (Tamoxifeno)

WAXS (Difracción de rayos X de ángulo ancho)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN	1
1. ABSTRACT	3
2. INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
2.1. Desarrollo del tamoxifeno como fármaco	5
2.2. Metabolismo del tamoxifeno.....	6
2.3. Efectos del tamoxifeno sobre las membranas biológicas	8
2.4. Sistemas de membranas modelo.....	9
2.5. Breve descripción de la metodología experimental	10
3. Referencias.....	13
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	20
5. PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL	22
Publicación 1	24
Publicación 2	26
Publicación 3	28
6. CONCLUSIONES.....	30

1. RESUMEN

La elevada naturaleza lipofílica de los fármacos antineoplásicos tamoxifeno (TMX) y 4 hidroxitamoxifeno (HTMX), de amplia utilización en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama positivos para el receptor de estrógenos (ER) hace que se repartan rápidamente en las membranas celulares. El objetivo general de esta tesis es profundizar en el efecto de dichas sustancias sobre la estructura y funcionalidad de las membranas fosfolípicas. En este estudio se ha seguido fundamentalmente una aproximación biofísica, utilizando técnicas experimentales y simulaciones por dinámica molecular (MD) de amplio uso en este campo.

TMX y HTMX afectan al comportamiento de fase de sistemas de 1,2-dipalmitil-sn-glicero-3-fosfolina (DPPC), dando lugar a la formación de dominios enriquecidos en el fármaco dentro de la bicapa (separación lateral de fases), si bien ambos compuestos se localizan en regiones distintas dentro de la membrana. Los datos de MD apoyan la tendencia de estos compuestos a formar agregados dentro de la membrana, y localizan al TMX a todo lo largo de la bicapa, mientras que el HTMX se sitúa más próximo a la interfase lípido/agua.

La incorporación de TMX en sistemas de 1,2-dielaidil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DEPE) produce un ensanchamiento progresivo de la transición de fase de lamelar-L β (gel) a lamelar-L α (líquido-cristalino), y disminuye la temperatura de transición. La transición L β /L α presenta múltiples endotermas, indicando una segregación lateral de diferentes dominios TMX/DEPE en el plano de la bicapa. La incorporación de TMX y HTMX también produce un ensanchamiento y desplazamiento de la transición de fase de lamelar-L α a hexagonal invertida-HII. A partir de los diagramas de fase se infiere que ambos compuestos facilitan la formación de la fase no lamelar HII. La espectroscopía FTIR muestra que ni el TMX ni el HTMX perturban de modo significativo el estado de hidratación de la bicapa de DEPE. Las simulaciones de MD indican que estos fármacos no afectan el grosor de la membrana, el área/lípido, o la conformación de las moléculas de DEPE, pero sí se muestra una localización distinta para ambos compuestos, y una diferente tendencia a la agregación.

El TMX provoca la permeabilización de membranas de 1-palmitil-2-oleil-sn-glicero-3-fosfolina (POPC) de modo rápido y extenso, siendo el efecto del HTMX mucho más débil. Las curvas de salida de contenidos liposomales se ajustan a dos componentes, dando dos constantes de velocidad correspondientes a un proceso lento y otro rápido. Es muy interesante el hecho de que la incorporación de fosfatidilglicerol o fosfatidiletanolamina protege a la membrana de la permeabilización inducida por los fármacos, sugiriéndose una explicación a partir de las simulaciones de MD. La espectroscopía FTIR muestra un aumento de *confórmeros gauche* y una deshidratación de la región polar de la membrana por efecto de TMX y HTMX.

De los resultados obtenidos y analizados en esta Memoria se concluye que tanto TMX como HTMX se incorporan a membranas fosfolípicas y forman dominios segregados en el plano de la bicapa. El TMX se puede localizar a todo lo largo de la bicapa fosfolípica, mientras que el HTMX se sitúa más próximo a la interfase lípido/agua. Estos dos fármacos desordenan la zona de las cadenas acílicas, y deshidratan la región de las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana, siendo los efectos del TMX significativamente más intensos. Por otra parte, TMX y HTMX pueden regular la curvatura local de la membrana, y así promover la formación de fases no-lamelares. Finalmente, se muestra que TMX, y en menor medida HTMX, permeabiliza membranas compuestas de fosfatidilcolina, permitiendo la liberación del contenido acuoso de las vesículas al medio externo. La magnitud de esta acción se correlaciona con la distinta capacidad de formar agregados y la distinta localización de ambos compuestos dentro de la bicapa lipídica. La permeabilización de membranas inducida por estos fármacos está modulada por la composición lipídica. Así, fosfolípidos como el fosfatidilglicerol y la fosfatidiletanolamina estabilizan la membrana frente a la permeabilización. Esto es debido a un aumento de las interacciones electrostáticas en la región de las cabezas polares, y a la posibilidad de formación de enlaces de hidrógeno, lo que se traduce en una membrana más cohesionada.

Estos datos podrían aportar una base molecular para algunas de las acciones farmacológicas del TMX, y HTMX, no relacionadas con su unión al receptor de estrógenos, o incluso explicar alguno de los múltiples efectos secundarios concomitantes a la terapia con estos fármacos.

1. ABSTRACT

The highly lipophilic nature of the antineoplastic drugs tamoxifen (TMX) and 4-hydroxitamoxifen (HTMX), widely used for the treatment of patients with ER-positive breast cancer, makes them prompt to partition into cell membranes. The general goal of this thesis is to deepen into the effect of those drugs on the structure and functionality of phospholipid membranes. This study has followed a biophysical experimental approach, using experimental techniques as well as molecular dynamics (MD) simulations widely used in these types of studies.

TMX and HTMX affect the phase behaviour of systems composed of the phospholipid 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (DPPC), giving rise to drug-enriched domains within the bilayer (lateral phase separation), but both compounds locate in different regions within the membrane. MD data support the tendency of these compounds to aggregate inside the membrane, and locate TMX all along the bilayer, whereas HTMX is placed closer to the lipid/water interface.

Incorporation of TMX into systems composed of 1,2-dielaidoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine (DEPE) gives rise to a widening of the lamellar- L_{β} to lamellar- L_{α} phase transition, decreasing phase transition temperature. The L_{β}/L_{α} phase transition shows multiple endotherms, indicating a lateral segregation of TMX/DEPE domains within the plane of the bilayer. TMX and HTMX also displace and widen the lamellar-to-hexagonal- H_{II} phase transition. Phase diagrams show that both drugs facilitate formation of the hexagonal- H_{II} phase. FTIR spectroscopy shows that neither TMX nor HTMX induce a significant perturbation of DEPE bilayer hydration. MD simulations indicate that both compounds do not affect bilayer thickness, area per lipid, or the conformation of DEPE molecules, but do show a different location, and a different aggregation behaviour, of both compounds.

TMX provokes rapid and extensive membrane permeabilization in 1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POPC) systems, the effect of HTMX being much weaker. Liposomal contents leakage curves are adjusted to two components, yielding rate constants corresponding to a slow and a fast processes. Interestingly, incorporation of phosphatidylglycerol or phosphatidylethanolamine protects the membrane against drug-induced permeabilization, MD providing data for a feasible

explanation. FTIR shows an increase in *gauche* conformers, and a dehydration of the polar region of the membrane by effect of TMX or HTMX.

The results shown in this thesis allow to conclude that TMX, as well as HTMX, incorporate into phospholipid membranes, forming domains segregated with the plane of the bilayer. Whereas TMX can locate all along the bilayer, HTMX is mostly found closer to the lipid/water interface. Both drugs perturb the region of the phospholipid acyl chains, and dehydrate the polar headgroups region, the effects of TMX being quantitatively more significant. TMX and HTMX can regulate membrane curvatur, and thus to promote formation of non-lamellar phases. Finally it is shown that TMX, and HTMX to a lesser extent, permeabilize phosphatidylcholine membranes, allowing release of liposome aqueous contents. This action correlates with their distinct capacity to form aggregates, and their different location with the lipid bilayer. Drug-induced membrane permeabilization is modulated by lipid composition, with phosphatidylglycerol and phosphatidylethanolamine having a protecting role. This is due to increased electrostatic interactions in the region of the polar headgroups, and the possibility of forming hydrogen bonds, what results in a more compact membrane.

Our data could provide a molecular basis for some of the pharmacological actions of TMX, and HTMX, not related to estrogen receptor binding, or even explain some the various side effects concomitant to therapy with these two drugs.

2. INTRODUCCIÓN GENERAL

2.1. Desarrollo del tamoxifeno como fármaco

La historia del tamoxifeno (ICI 46,474), *trans*-1-(4-β-dimetilaminoetoxifenil)-1,2-difenilbut-1-eno (Figura 1) es, como ocurre con algún otro medicamento, muy interesante. Este fármaco pionero no se concibió inicialmente como parte de un plan de la industria farmacéutica para conseguir un "éxito de ventas", sino que el tamoxifeno fue un producto huérfano que falló en su primera indicación como "píldora del día después".

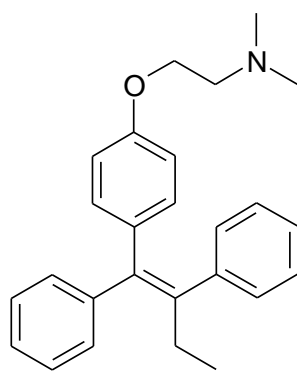


Figura 1. Estructura del tamoxifeno.

La compañía terminó el desarrollo clínico de este medicamento en 1972 y, después de un período de desconsideración por parte de la comunidad clínica a mitad de la década de 1970, se sucedieron los éxitos. El éxito de este compuesto se basó por una parte en que personas concretas estuvieran en el sitio adecuado en el momento adecuado, y por otra en un "pacto entre caballeros" entre la industria (ICI Pharmaceuticals Division, ahora AstraZeneca) y la academia (Worcester Foundation y la Universidad de Leeds), para desarrollar una nueva estrategia para el tratamiento y prevención del cáncer de mama. El período de gestación de esa estrategia fue la década de los 1970 (V. C. Jordan, 1976; V. C. Jordan & Allen, 1980; V. C. Jordan & Koerner, 1975; V. Craig Jordan, 2008). Los principios concebidos para dirigirse al receptor de estrógenos tumoral (ER) y usar una terapia endocrina adyuvante a largo plazo, se trasladaron de modo eficaz a los ensayos clínicos, los cuales demostraron una tremenda y duradera reducción de la mortalidad (Abe et al., 2011). Se estima que cientos de miles de mujeres, tal vez

millones, siguen vivas hoy en día gracias a esta exitosa transferencia de las investigaciones llevadas a cabo en la década de los 1970. Además, la investigación de laboratorio sobre la prevención de la carcinogénesis mamaria en animales (V. C. Jordan, 1976; V. C. Jordan & Allen, 1980), se trasladaría a unos exitosos ensayos clínicos (Fisher et al., 1998, 2005; Powles et al., 2007), con el resultado de la aprobación por la FDA del tamoxifeno como el primer medicamento para la reducción de la incidencia de cáncer de mama en mujeres de riesgo pre- y postmenopáusicas. Se sabía del vínculo existente entre los estrógenos y el crecimiento de algunos cánceres de mama metastásicos, sin embargo el entusiasmo por parte de la industria farmacéutica era bajo. Así, el tamoxifeno, tras un incierto comienzo en los 1960, avanzó solo durante los 1970 para convertirse en el tratamiento antihormonal de elección para la prevención del cáncer de mama en los siguientes 20 años. A pesar de todos estos altibajos en su historia, el tamoxifeno sigue siendo un fármaco salvavidas barato y eficaz en todo el mundo. De hecho sigue vigente el concepto, establecido en los primeros estudios, de que "a más largo mejor", con respecto a la duración de la terapia adyuvante con tamoxifeno para pacientes de cáncer de mama ER-positivo, de modo que se sabe que un tratamiento de 10 años es sustancialmente mejor que uno de 5 (Davies et al., 2013). Así, el descubrimiento del tamoxifeno, tras una rigurosa investigación farmacológica, condujo al establecimiento de un nuevo grupo de fármacos: los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM, de las siglas en inglés) (V. C. Jordan, 2001; V. Craig Jordan, 2009; V. Craig Jordan & O'Malley, 2007).

Aunque los beneficios del tamoxifeno son importantes, su uso está asociado con un aumento de efectos secundarios de riesgo tales como golpes de calor, anomalías menstruales, cáncer de útero o fenómenos tromboembólicos (Fabian & Kimler, 2001; Mikelman et al., 2017). Dado que el uso del tamoxifeno se asocia con un incremento en el riesgo de cáncer, y otros efectos desagradables, generalmente la terapia se limita a 5 años, si bien, como se comentó antes, tratamientos más largos son más eficaces (Davies et al., 2013).

2.2. Metabolismo del tamoxifeno

Los estudios farmacológicos del tamoxifeno en el cuerpo humano indican su

conversión en tres metabolitos activos: 4-hidroxitamoxifeno, *N*-desmetiltamoxifeno, y 4-hidroxi-*N*-desmetiltamoxifeno, conocido como endoxifeno (Figura 2) (Hoskins et al., 2009; V. Craig Jordan, 2007). Estos metabolitos son potentes antiestrógenos y se usan para comprender el mecanismo de acción del tamoxifeno (H. Wiseman et al., 1993; Wu et al., 2009). El perfil farmacológico del tamoxifeno indica pues que se trata de un profármaco, y que su actividad antineoplásica tiene lugar a través de su metabolito activo, el 4-hidroxitamoxifeno, y su análogo desmetilado endoxifeno. Estos compuestos son generados por acción de isoenzimas hepáticas de CYP2D6 y CYP3A4/3A5, que producen su hidroxilación y su posterior desmetilación. Está establecido que pacientes con formas variantes del gen CYP 2D6 no reciben los beneficios terapéuticos de la administración de tamoxifeno, o incluso sufren relapsos debido a la lenta conversión del tamoxifeno en sus metabolitos activos (Beverage et al., 2007; Dezentjé et al., 2009; Schroth et al., 2009).

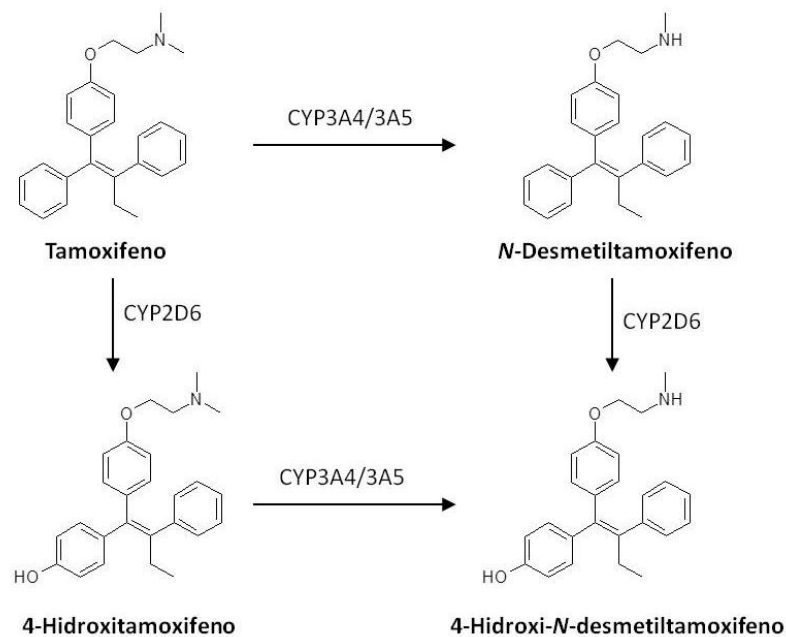


Figura 2. Principales conversiones metabólicas del tamoxifeno en el ser humano.

Actualmente, el uso del tamoxifeno para cáncer de mama ER-positivo está bien establecido, si bien se ha determinado también que entre un 5 y un 10% de los ER-negativos responden asimismo al tratamiento (Manna & Mukhopadhyay, 2011). Variaciones en la expresión del receptor α relacionado con el ER, el subtipo β de ER, el microambiente tumoral, o la epigenética también pueden afectar a la sensibilidad al

fármaco (Manna & Mukhopadhyay, 2011). A final de los 1980 se demostró que el tamoxifeno y compuestos relacionados se comportan como potentes inhibidores del receptor del promotor de tumores proteína quinasa C (PKC), una enzima clave implicada en la regulación del crecimiento celular (O'brian et al., 1986). En 1996, la evidencia inicial de la interacción del tamoxifeno en el metabolismo de esfingolípidos, implicada en la supervivencia de células cancerosas, se demostró en líneas celulares de melanoma y cáncer cervical (Cabot et al., 1996). Esto llevó a sugerir el uso potencial como adyuvante del tamoxifeno para aumentar la toxicidad de agentes quimioterapéuticos en numerosos tipos de cáncer (Maurer et al., 2000).

2.3. Efectos del tamoxifeno sobre las membranas biológicas

La interacción del tamoxifeno, altamente hidrofóbico, con las membranas biológicas es de considerable interés, si bien el número de investigaciones dedicadas a su estudio es escaso. El tamoxifeno, el 4-hidroxitamoxifeno, y otros derivados, inhiben la peroxidación lipídica en varios sistemas de membranas biológicas y membranas modelo (Niranjan et al., 2021; Tomková et al., 2019; Helen Wiseman et al., 1990). A la luz de la estructura química de estos compuestos, es muy improbable que actúen como antioxidantes de rotura de cadena, dado que no poseen átomos de hidrógeno fácilmente cedibles. Sin embargo, la similitud estructural del tamoxifeno con el colesterol, que también actúa como antioxidante, y con el ergosterol, un antioxidante aún más potente, sugiere que su acción podría estar basada en su efecto sobre la fluidez de las membranas. De hecho, diversos estudios han mostrado que el tamoxifeno, al igual que el colesterol, tiene un efecto modulador sobre la fluidez de membranas biológicas y membranas modelo (Custódio et al., 1993; Dicko et al., 1999; Engelke et al., 2001; Helen Wiseman et al., 1993).

Por otra parte, varias publicaciones han mostrado una influencia del tamoxifeno, y derivados, sobre las propiedades fisicoquímicas de membranas modelo de distinta composición. Así, se ha publicado que este fármaco afecta al comportamiento de fase de diversas fosfatidilcolinas (Bilge et al., 2014; Custódio et al., 1993; Dicko et al., 1999; Engelke et al., 2001; Khadka et al., 2015), si bien con

resultados en algunos casos contradictorios. Es importante destacar que, hasta la presente Memoria, no se había publicado ningún estudio sobre la interacción del tamoxifeno, o sus metabolitos, con sistemas de fosfatidiletanolamina, que constituye el segundo fosfolípido más importante en todas las membranas biológicas (van der Veen et al., 2017; Vance, 2008).

2.4. Sistemas de membranas modelo

La mayoría de fármacos están diseñados para dirigirse a proteínas solubles y proteínas de membrana, ya que la mayor parte de las enfermedades están relacionadas con el mal funcionamiento de estas biomoléculas (Yildirim et al., 2007). Así, mientras que las interacciones fármaco-proteína se han estudiado sistemáticamente y en profundidad, no ocurre lo mismo con las interacciones de esos mismos compuestos con la membrana que rodea las proteínas, que son poco analizadas.

Los sistemas de membranas modelo biomiméticos ofrecen una plataforma alternativa a las membranas naturales, y permiten estudiar las interacciones fármaco-membrana bajo condiciones controladas y bien definidas (Bourgau & Couvreur, 2014). La estructura básica de cualquier membrana es la bicapa lipídica, y se han desarrollado diferentes modelos para imitar las propiedades estructurales y funcionales fundamentales de esta bicapa. Algunos de estos modelos son las vesículas fosfolipídicas o liposomas, monocapas de Langmuir, bicapas sólidas soportadas, etc. Cada uno de estos sistemas tiene sus ventajas e inconvenientes pero, en cualquier caso, todos se han caracterizado y analizado de modo extenso mediante diversas técnicas biofísicas. Estos estudios han mostrado que los sistemas modelo permiten simular de modo muy preciso las características específicas de una membrana, lo que ofrece la posibilidad de investigar sistemáticamente procesos relacionados con las membranas fosfolipídicas.

En los estudios descritos en esta Memoria se han utilizado vesículas fosfolipídicas modelo (liposomas). Los liposomas son vesículas fosfolipídicas esféricas formadas por una sola bicapa (vesículas unilamelares), o varias bicapas concéntricas (vesículas multilamelares). Estos se pueden preparar por diversos métodos, como la dispersión en medios acuosos, sonicación, o extrusión por filtros de tamaño de poro

definido (Nakhaei et al., 2021). La gran ventaja de estos sistemas es que se puede variar la composición de la bicapa, usando lípidos tanto naturales como sintéticos, así como el contenido atrapado en su interior acuoso (Davies et al., 2013) (Filipczak et al., 2020).

En el caso de los agentes antineoplásicos, como el tamoxifeno, las principales dianas terapéuticas son intracelulares, por lo que deben cruzar la membrana plasmática y, eventualmente, la envuelta nuclear para ejercer su acción farmacológica. Además, la extensa compartimentalización de las células eucarióticas hace que estos fármacos puedan también interactuar con orgánulos como el retículo endoplásmico, Golgi, o las mitocondrias, una vez que alcanzan el citosol. Así pues el conocimiento de las interacciones de los fármacos antineoplásicos con las membranas celulares es un campo importante de investigación, directamente relacionado con la actividad farmacológica del compuesto. La unión del fármaco y su inserción/acumulación en la membrana va a afectar a la estructura y propiedades de la misma. Así, una gran parte de la información disponible sobre la influencia de fármacos anticancerígenos en las biomembranas se ha obtenido usando sistemas modelo como los descritos anteriorente (Bourgau & Couvreur, 2014).

2.5. Breve descripción de la metodología experimental

Los estudios que se presentan en esta tesis doctoral se han llevado cabo siguiendo fundamentalmente una aproximación biofísica, utilizando técnicas experimentales, así como simulaciones por dinámica molecular (MD) de amplio uso en este campo. A continuación se describe sucintamente las más relevantes.

- Como modelo de membrana se han usado tanto vesículas multilamelares (MLV), como vesículas unilamelares grandes (LUV) (Jesorka & Orwar, 2008). Las MLV se han preparado esencialmente por el método de hidratación de películas finas, y las LUV por el método de extrusión a través de filtros de policarbonato (Filipczak et al., 2020).
- Calorimetría diferencial de barrido (DSC). La técnica de DSC de alta sensibilidad

mide los minúsculos cambios de calor que absorbe o desprende una muestra, lipídica en este caso, al someterla a un calentamiento o enfriamiento continuo (Lewis et al., 2007). Los termogramas obtenidos permiten analizar el efecto de los fármacos bajo estudio sobre el comportamiento termotrópico de fase de los distintos fosfolípidos. A partir de los datos de DSC se pueden elaborar diagramas parciales de fase para el componente lipídico, que permiten analizar la influencia de los compuestos bajo estudio sobre el comportamiento de fase de los distintos fosfolípidos.

- Espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR). La FTIR es un tipo de espectroscopía vibracional que aporta información, sobre la interacción droga-fosfolípido en nuestro caso, a partir del efecto en la posición e intensidad de bandas de absorción características procedentes de grupos de la cabeza polar (fosfato, carbonilo), como de las cadenas acílicas (metileno, metilo terminal) de los fosfolípidos (Schultz & Levin, 2011). Los equipos actuales permiten realizar barridos de temperatura y analizar estas interacciones tanto en fase gel, como en fase líquido-cristalina, o incluso en sistemas no lamelares.
- Las técnicas de difracción/dispersión de rayos X, esenciales en la determinación de la estructura de proteínas y ácidos nucleicos (Blundell, 2021), encuentran también aplicación en el caso de membranas fosfolipídicas apiladas, como es el caso de los sistemas multilamelares (Blaurock, 1982). El equipo disponible, que permite medidas tanto en el ángulo estrecho como en el ángulo ancho, aporta datos para la elaboración de los perfiles de densidad electrónica de los fosfolípidos en ausencia y presencia de los fármacos bajo estudio, analizando su efecto sobre el grosor de la bicapa, la organización de las cadenas acílicas, y el polimorfismo lipídico (formación de fases no lamelares, como la fase hexagonal invertida-H_{II}).
- Espectroscopía de fluorescencia. Dentro de las técnicas espectroscópicas, la espectroscopía de fluorescencia es tal vez la más versátil, por la gran variedad de ensayos que permite, que van desde determinaciones cuantitativas básicas hasta técnicas de microscopía confocal (Macháñ & Wohland, 2014). En los estudios que se presentan, se han usado ensayos de fluorescencia en dos tipos de aplicaciones. En la primera de ellas se ha monitorizado el efecto de los

compuestos bajo estudio sobre la fluidez de membrana, para lo que se han usado sondas fluorescentes como el DPH y el TMA-DPH. En segundo lugar se ha usado un ensayo de fluorescencia para analizar cuantitativamente la permeabilización de bicapas inducida por incorporación de los fármacos. Este ensayo de fluorescencia se base en la liberación de la sonda fluorescente 5,(6)-carboxifluoresceína encapsulada en el compartimento acuoso de LUV de distinta composición.

- Finalmente, como complemento a los estudios experimentales, se han llevado a cabo simulaciones por ordenador de dinámica molecular (Mori et al., 2016; Róg et al., 2021). En este tipo de simulaciones se ha construido una bicapa lipídica a partir del fosfolípido seleccionado, y se han incorporado los fármacos bajo estudio a relaciones molares del mismo orden que las usadas en los estudios experimentales. Las simulaciones se han realizado mediante GROMACS, usando parámetros de campo de fuerza CHARMM36. Las estructuras de membrana iniciales se construyeron usando Packmol, y se usaron barridos productivos en torno a 120 ns. Las representaciones gráficas se hicieron con PyMOL. Las simulaciones por dinámica molecular se han convertido en una herramienta muy valiosa para investigar problemas biológicos, siempre como complemento a los estudios experimentales.

3. Referencias

- Abe, O., Abe, R., Enomoto, K., Kikuchi, K., Koyama, H., Masuda, H., Nomura, Y., Ohashi, Y., Sakai, K., Sugimachi, K., Toi, M., Tominaga, T., Uchino, J., Yoshida, M., Haybittle, J. L., Leonard, C. F., Calais, G., Geraud, P., Collett, V., ... Caffier, H. (2011). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet (London, England)*, *378*(9793), 771–784. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60993-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60993-8)
- Beverage, J. N., Sissung, T. M., Sion, A. M., Danesi, R., & Figg, W. D. (2007). CYP2D6 polymorphisms and the impact on tamoxifen therapy. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *96*(9), 2224–2231. <https://doi.org/10.1002/JPS.20892>
- Bijl AE Ron H N van Schaik AE Laureen A Lammers AE Albert Hofman AE Arnold G Vulto AE Teun van Gelder AE Bruno H Ch Stricker AE Loes E Visser, M. J. (n.d.). *The CYP2D6*4 polymorphism affects breast cancer survival in tamoxifen users*. <https://doi.org/10.1007/s10549-008-0272-2>
- Bilge, D., Sahin, I., Kazanci, N., & Severcan, F. (2014). Interactions of tamoxifen with distearoyl phosphatidylcholine multilamellar vesicles: FTIR and DSC studies. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *130*, 250–256. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.027>
- Blaurock, A. E. (1982). Evidence of bilayer structure and of membrane interactions from X-ray diffraction analysis. *Biochimica et Biophysica Acta*, *650*(4), 167–207. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(82\)90016-8](https://doi.org/10.1016/0304-4157(82)90016-8)
- Blundell, T. L. (2021). The first resolution revolution in protein structure analysis: X-ray diffraction of polypeptide conformations and globular protein folds in 1950s and 1960s. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, *167*, 32–40. <https://doi.org/10.1016/J.PBIOMOLBIO.2021.09.002>
- Bourgaux, C., & Couvreur, P. (2014). Interactions of anticancer drugs with biomembranes: what can we learn from model membranes? *Journal of Controlled Release : Official Journal of the Controlled Release Society*, *190*, 127–138. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2014.05.012>
- Cabot, M. C., Giuliano, A. E., Volner, A., & Han, T. Y. (1996). Tamoxifen retards

- glycosphingolipid metabolism in human cancer cells. *FEBS Letters*, 394(2), 129–131. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00942-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00942-8)
- Custódio, J. B. A., Almeida, L. M., & Madeira, V. M. C. (1993). The anticancer drug tamoxifen induces changes in the physical properties of model and native membranes. *BBA - Biomembranes*, 1150(2), 123–129. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90080-J](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90080-J)
- Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., Raina, V., Abraham, M., Medeiros Alencar, V. H., Badran, A., Bonfill, X., Bradbury, J., Clarke, M., Collins, R., Davis, S. R., Delmestri, A., Forbes, J. F., Haddad, P., Hou, M. F., Inbar, M., ... Peto, R. (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial. *Lancet (London, England)*, 381(9869), 805–816. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61963-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61963-1)
- Dezentjé, V. O., Guchelaar, H. J., Nortier, J. W. R., Van Develde, C. J. H., & Gelderblom, H. (2009). Clinical implications of CYP2D6 genotyping in tamoxifen treatment for breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(1), 15–21. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-2006>
- Dicko, A., Morissette, M., Ben Ameer, S., Pézolet, M., & Di Paolo, T. (1999). Effect of estradiol and tamoxifen on brain membranes: Investigation by infrared and fluorescence spectroscopy. *Brain Research Bulletin*, 49(6), 401–405. [https://doi.org/10.1016/S0361-9230\(99\)00066-0](https://doi.org/10.1016/S0361-9230(99)00066-0)
- Engelke, M., Bojarski, P., Bloß, R., & Diehl, H. (2001). Tamoxifen perturbs lipid bilayer order and permeability: Comparison of DSC, fluorescence anisotropy, Laurdan generalized polarization and carboxyfluorescein leakage studies. *Biophysical Chemistry*, 90(2), 157–173. [https://doi.org/10.1016/S0301-4622\(01\)00139-9](https://doi.org/10.1016/S0301-4622(01)00139-9)
- Fabian, C. J., & Kimler, B. F. (2001). Chemoprevention for high-risk women: Tamoxifen and beyond. *Breast Journal*, 7(5), 311–320. <https://doi.org/10.1046/J.1524-4741.2001.21570.X>
- Filipczak, N., Pan, J., Yalamarty, S. S. K., & Torchilin, V. P. (2020). Recent advancements in liposome technology. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 156, 4–22. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2020.06.022>
- Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Cecchini, R. S., Cronin, W. M., Robidoux,

- A., Bevers, T. B., Kavanah, M. T., Atkins, J. N., Margolese, R. G., Runowicz, C. D., James, J. M., Ford, L. G., & Wolmark, N. (2005). Tamoxifen for the prevention of breast cancer: current status of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 study. *Journal of the National Cancer Institute*, *97*(22), 1652–1662.
<https://doi.org/10.1093/JNCI/DJI372>
- Fisher, B., Costantino, J. P., Wickerham, D. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin, W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L., & Wolmark, N. (1998). Tamoxifen for prevention of breast cancer: report of the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study. *Journal of the National Cancer Institute*, *90*(18), 1371–1388.
<https://doi.org/10.1093/JNCI/90.18.1371>
- Hoskins, J. M., Carey, L. A., & McLeod, H. L. (2009). CYP2D6 and tamoxifen: DNA matters in breast cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *9*(8), 576–586.
<https://doi.org/10.1038/NRC2683>
- Jesorka, A., & Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry (Palo Alto, Calif.)*, *1*(1), 801–832.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ANCHEM.1.031207.112747>
- Jordan, V. C. (1976). Effect of tamoxifen (ICI 46,474) on initiation and growth of DMBA-induced rat mammary carcinomata. *European Journal of Cancer (1965)*, *12*(6), 419–424. [https://doi.org/10.1016/0014-2964\(76\)90030-X](https://doi.org/10.1016/0014-2964(76)90030-X)
- Jordan, V. C. (2001). Selective estrogen receptor modulation: A personal perspective. *Cancer Research*, *61*(15), 5683–5687.
- Jordan, V. C., & Allen, K. E. (1980). Evaluation of the antitumour activity of the non-steroidal antioestrogen monohydroxytamoxifen in the DMBA-induced rat mammary carcinoma model. *European Journal of Cancer*, *16*(2), 239–251.
[https://doi.org/10.1016/0014-2964\(80\)90156-5](https://doi.org/10.1016/0014-2964(80)90156-5)
- Jordan, V. C., & Koerner, S. (1975). Tamoxifen (ICI 46,474) and the human carcinoma 8S oestrogen receptor. *European Journal of Cancer*, *11*(3), 205–206.
[https://doi.org/10.1016/0014-2964\(75\)90119-X](https://doi.org/10.1016/0014-2964(75)90119-X)
- Jordan, V. Craig. (2007). New insights into the metabolism of tamoxifen and its role in the treatment and prevention of breast cancer. *Steroids*, *72*(13), 829–842.
<https://doi.org/10.1016/J.STEROIDS.2007.07.009>

- Jordan, V. Craig. (2008). Tamoxifen: catalyst for the change to targeted therapy. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 44(1), 30.
<https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2007.11.002>
- Jordan, V. Craig. (2009). Chemosuppression of Breast Cancer with Tamoxifen: Laboratory Evidence and Future Clinical Investigations.
<Http://Dx.Doi.Org/10.3109/07357908809082124>, 6(5), 589–595.
<https://doi.org/10.3109/07357908809082124>
- Jordan, V. Craig, & O'Malley, B. W. (2007). Selective estrogen-receptor modulators and antihormonal resistance in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 25(36), 5815–5824. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.3886>
- Khadka, N. K., Cheng, X., Ho, C. S., Katsaras, J., & Pan, J. (2015). Interactions of the Anticancer Drug Tamoxifen with Lipid Membranes. *Biophysical Journal*, 108(10), 2492–2501. <https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.04.010>
- Lewis, R. N. A. H., Mannoock, D. A., & McElhaney, R. N. (2007). Differential scanning calorimetry in the study of lipid phase transitions in model and biological membranes: practical considerations. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 400, 171–195. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-519-0_12
- Macháň, R., & Wohland, T. (2014). Recent applications of fluorescence correlation spectroscopy in live systems. *FEBS Letters*, 588(19), 3571–3584.
<https://doi.org/10.1016/J.FEBSLET.2014.03.056>
- Manna, M., & Mukhopadhyay, C. (2011). Molecular dynamics simulations of the interactions of kinin peptides with an anionic POPG bilayer. *Langmuir : The ACS Journal of Surfaces and Colloids*, 27(7), 3713–3722.
<https://doi.org/10.1021/LA104046Z>
- Maurer, B. J., Melton, L., Billups, C., Cabot, M. C., & Reynolds, C. P. (2000). Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and modulators of ceramide metabolism. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(23), 1897–1909. <https://doi.org/10.1093/JNCI/92.23.1897>
- Mikelman, S., Mardirossian, N., & Gnegy, M. E. (2017). Tamoxifen and amphetamine abuse: Are there therapeutic possibilities? *Journal of Chemical Neuroanatomy*, 83–84, 50–58. <https://doi.org/10.1016/J.JCHEMNEU.2016.08.004>
- Mori, T., Miyashita, N., Im, W., Feig, M., & Sugita, Y. (2016). Molecular dynamics

- simulations of biological membranes and membrane proteins using enhanced conformational sampling algorithms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858(7), 1635–1651.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2015.12.032>
- Nakhaei, P., Margiana, R., Bokov, D. O., Abdelbasset, W. K., Jadidi Kouhbanani, M. A., Varma, R. S., Marofi, F., Jarahian, M., & Beheshtkhoo, N. (2021). Liposomes: Structure, Biomedical Applications, and Stability Parameters With Emphasis on Cholesterol. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9.
<https://doi.org/10.3389/FBIOE.2021.705886>
- Niranjan, M. K., Koiri, R. K., & Srivastava, R. (2021). Expression of estrogen receptor alpha in response to stress and estrogen antagonist tamoxifen in the shell gland of *Gallus gallus domesticus*: involvement of anti-oxidant system and estrogen. *Stress (Amsterdam, Netherlands)*, 24(3), 261–272.
<https://doi.org/10.1080/10253890.2019.1710127>
- O'brian, C. A., Liskamp, R. M., Solomon, D. H., & Bernard Weinstein, I. (1986). Triphenylethylenes: A new class of protein kinase c inhibitors. *Journal of the National Cancer Institute*, 76(6), 1243–1246.
<https://doi.org/10.1093/JNCI/76.6.1243>
- Powles, T. J., Ashley, S., Tidy, A., Smith, I. E., & Dowsett, M. (2007). Twenty-year follow-up of the Royal Marsden randomized, double-blinded tamoxifen breast cancer prevention trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 99(4), 283–290.
<https://doi.org/10.1093/JNCI/DJK050>
- Róg, T., Girysh, M., & Bunker, A. (2021). Mechanistic Understanding from Molecular Dynamics in Pharmaceutical Research 2: Lipid Membrane in Drug Design. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 14(10).
<https://doi.org/10.3390/PH14101062>
- Schroth, W., Goetz, M. P., Hamann, U., Fasching, P. A., Schmidt, M., Winter, S., Fritz, P., Simon, W., Suman, V. J., Ames, M. M., Safgren, S. L., Kuffel, M. J., Ulmer, H. U., Boländer, J., Strick, R., Beckmann, M. W., Koelbl, H., Weinshilboum, R. M., Ingle, J. N., ... Brauch, H. (2009). Association between CYP2D6 polymorphisms and outcomes among women with early stage breast cancer treated with tamoxifen. *Jama*, 302(13), 1429–1436. <https://doi.org/10.1001/jama.2009.1420>

- Schultz, Z. D., & Levin, I. W. (2011). Vibrational Spectroscopy of Biomembranes. <https://doi.org/10.1146/Annurev-Anchem-061010-114048>, 4, 343–366.
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ANCHEM-061010-114048>
- Tomková, V., Sandoval-Acuña, C., Torrealba, N., & Truksa, J. (2019). Mitochondrial fragmentation, elevated mitochondrial superoxide and respiratory supercomplexes disassembly is connected with the tamoxifen-resistant phenotype of breast cancer cells. *Free Radical Biology & Medicine*, 143, 510–521.
<https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2019.09.004>
- van der Veen, J. N., Kennelly, J. P., Wan, S., Vance, J. E., Vance, D. E., & Jacobs, R. L. (2017). The critical role of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine metabolism in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1859(9 Pt B), 1558–1572. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMEM.2017.04.006>
- Vance, J. E. (2008). Phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine in mammalian cells: two metabolically related aminophospholipids. *Journal of Lipid Research*, 49(7), 1377–1387. <https://doi.org/10.1194/jlr.R700020-JLR200>
- Wiseman, H., Paganga, G., Rice-Evans, C., & Halliwell, B. (1993). Protective actions of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen against oxidative damage to human low-density lipoproteins: a mechanism accounting for the cardioprotective action of tamoxifen? *Biochemical Journal*, 292(3), 635–638.
<https://doi.org/10.1042/BJ2920635>
- Wiseman, Helen, Cannon, M., Arnstein, H. R. V., & Halliwell, B. (1990). Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen introduced into liposomes: Similarity to cholesterol and ergosterol. *FEBS Letters*, 274(1–2), 107–110. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)81341-K](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)81341-K)
- Wiseman, Helen, Quinn, P., & Halliwell, B. (1993). Tamoxifen and related compounds decrease membrane fluidity in liposomes. *FEBS Letters*, 330(1), 53–56.
[https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80918-k](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80918-k)
- Wu, X., Hawse, J. R., Subramaniam, M., Goetz, M. P., Ingle, J. N., & Spelsberg, T. C. (2009). The tamoxifen metabolite, endoxifen, is a potent antiestrogen that targets estrogen receptor a for degradation in breast cancer cells. *Cancer Research*, 69(5), 1722–1727. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3933>

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El marcado carácter lipofílico de los fármacos antineoplásicos tamoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno, de amplia utilización en el tratamiento de pacientes con cáncer de mama positivos para el receptor de estrógenos, hace que estos compuestos se acumulen rápidamente en las membranas celulares tras su administración. Si bien su principal acción farmacológica está basada en el bloqueo del receptor de estrógenos, su interacción con las membranas podría también explicar alguna de sus otras actividades, o incluso alguno de los múltiples efectos secundarios que presentan. En base a esta situación de partida, el objetivo general de esta tesis es profundizar en el efecto del tamoxifeno y el 4-hidroxitamoxifeno sobre la estructura y funcionalidad de membranas fosfolípicas, utilizando para ello sistemas vesiculares de membranas modelo. Esto se plasma en los siguientes objetivos específicos:

1. Estudiar la interacción de tamoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno con membranas fosfolípicas modelo compuestas del fosfolípido 1,2-dipalmitil-*sn*-glicero-3-fosfocolina, utilizando una aproximación experimental biofísica, así como simulaciones por dinámica molecular.
2. Analizar la influencia de tamoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno sobre la estructura y funcionalidad de sistemas formados por el fosfolípido sintético 1,2-dielaidil-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina, incidiendo en la modulación del comportamiento de fase de este fosfolípido. Se aplicará una aproximación experimental biofísica, complementada con simulaciones por dinámica molecular.
3. Caracterizar el mecanismo molecular de la permeabilización de membranas fosfolípicas modelo de distinta composición por tamoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno, utilizando ensayos cinéticos, técnicas biofísicas, así como simulaciones mediante dinámica molecular.

5. PUBLICACIONES ORIGINALES QUE CONFORMAN LA TESIS DOCTORAL

Publicación 1

Dissimilar action of tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen on phosphatidylcholine model membranes

Julia Ortiz , Francisco J. Aranda , José A. Teruel , Antonio Ortiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Facultad de Veterinaria,

Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, E-30100 Murcia, Spain

Biophysical Chemistry 278 (2021) 106681

<https://doi.org/10.1016/j.bpc.2021.106681>

ABSTRACT

The anticancer drug tamoxifen and its primary metabolite 4-hydroxytamoxifen tend to accumulate in membranes due to its strong hydrophobic character. Thus, in this work we have carried out a systematic study to investigate their effects on model phosphatidylcholine membranes. Tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen affect the phase behaviour of phosphatidylcholine model membranes, giving rise to formation of drug/dipalmitoylphosphatidylcholine domains, which is more evident in the case of 4-hydroxytamoxifen. These drugs have differential effects on the polar and apolar regions of the phospholipid supporting a different location of both compounds within the bilayer. Both compounds induce contents leakage in fluid phosphatidylcholine unilamellar liposomes, the effect of 4-hydroxytamoxifen being negligible as compared to that of tamoxifen. Molecular dynamics confirmed the tendency of both drugs to form clusters, tamoxifen locating all along the bilayer, whereas 4-hydroxytamoxifen mostly locates near the lipid/water interface, which can explain the different effects of both drugs in fluid phosphatidylcholine membranes.

Publicación 2

Anticancer drugs tamoxifen and 4-hydroxytamoxifen as effectors of
phosphatidylethanolamine lipid polymorphism

Julia Ortiz , José A. Teruel , Francisco J. Aranda , Antonio Ortiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Facultad de Veterinaria,

Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, E-30100 Murcia, Spain

Chemistry and Physics of Lipids 248 (2022) 105239

<https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2022.105239>

ABSTRACT

The interaction of tamoxifen (TMX) and its metabolite 4-hydroxytamoxifen (HTMX) with a biomimetic membrane model system composed of 1,2-dielaidoylphosphatidylethanolamine (DEPE) has been studied using a biophysical approach. Incorporation of TMX into DEPE bilayers gives rise to a progressive broadening of the $L\beta/L\alpha$ phase transition and a downward temperature shift. The $L\beta/L\alpha$ phase transition presents multiple endotherms, indicating a lateral segregation of TMX/DEPE domains within the plane of the bilayer. TMX and HTMX also widen and shift the $L\alpha$ to hexagonal-HII transition toward lower values, the phase diagrams showing that both compounds facilitate formation of the HII phase. TMX increases motional disorder of DEPE acyl chains in the $L\beta$, $L\alpha$ and HII phases, whereas the effect of HTMX is clearly different. In addition, neither TMX nor HTMX significantly perturb the hydration state of the polar headgroup region of DEPE. Molecular dynamics (MD) simulations indicate that these drugs do not affect membrane thickness, area per lipid, or the conformation of DEPE molecules. As a general rule, the interaction of HTMX with DEPE is qualitatively similar to TMX but less intense. However, a significant difference shown by MD is that HTMX is mainly placed around the center of each monolayer while TMX is located mainly at the center of the membrane, also having a greater tendency to cluster formation. These results are discussed to understand the modulation of phosphatidylethanolamine lipid polymorphism carried out by these drugs, which could be of relevance to explain their effects on enzyme activity or membrane permeabilization.

Publicación 3

On the Mechanism of Membrane Permeabilization by Tamoxifen and 4-Hydroxytamoxifen

Julia Ortiz, José A. Teruel , Francisco J. Aranda and Antonio Ortiz

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular-A, Facultad de Veterinaria,
Universidad de Murcia, E-30100 Murcia, Spain

Membranes 13 (2023) 292

<https://doi.org/10.3390/membranes13030292>

ABSTRACT

Tamoxifen (TMX), commonly used in complementary therapy for breast cancer, also displays known effects on the structure and function of biological membranes. This work presents an experimental and simulation study on the permeabilization of model phospholipid membranes by TMX and its derivative 4-hydroxytamoxifen (HTMX). TMX induces rapid and extensive vesicle contents leakage in phosphatidylcholine (PC) liposomes, with the effect of HTMX being much weaker. Fitting of the leakage curves for TMX, yields two rate constants, corresponding to a fast and a slow process, whereas in the case of HTMX, only the slow process takes place. Interestingly, incorporation of phosphatidylglycerol (PG) or phosphatidylethanolamine (PE) protects PC membranes from TMX-induced permeabilization. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) shows that, in the presence of TMX there is a shift in the CH₂ band frequency, corresponding to an increase in gauche conformers, and a shift in the C=O band frequency, indicating a dehydration of the polar region. A preferential association of TMX with PC, in mixed PC/PE systems, is observed by differential scanning calorimetry. Molecular dynamics (MD) simulations support the experimental results, and provide feasible explanations to the protecting effect of PG and PE. These findings add new information to explain the various mechanisms of the anticancer actions of TMX, not related to the estrogen receptor, and potential side effects of this drug.

6. CONCLUSIONES

1. Tamoxifeno y 4-hidroxitamoxifeno se incorporan a las membranas fosfolípicas y forman dominios segregados en el plano de la bicapa, en membranas fluidas. Las características estructurales y dinámicas de ambos agregados son significativamente distintas.
2. El tamoxifeno se puede localizar a todo lo largo de la bicapa fosfolípica, mientras que el 4-hidroxitamoxifeno se sitúa próximo a la interfase lípido/agua, lo que se traduce en efectos diferenciados sobre la estructura de la membrana.
3. Estos dos fármacos desordenan la zona de las cadenas acílicas, y deshidratan la región de las cabezas polares de los fosfolípidos de la membrana, siendo los efectos del tamoxifeno significativamente más intensos.
4. Tamoxifeno, y en menor medida 4-hidroxitamoxifeno, puede regular la curvatura local de la membrana, y así promover la formación de fases no-lamelares, como la fase hexagonal invertida- H_{II} . Este efecto es debido a la introducción de curvatura negativa por los agregados de los fármacos.
5. Tamoxifeno, y 4-hidroxitamoxifeno en menor extensión, permeabilizan membranas fosfolípicas modelo compuestas de fosfatidilcolina, induciendo la liberación del contenido acuoso de las vesículas al medio externo. La magnitud de esta acción muestra una estrecha correlación con la distinta capacidad de formar agregados y la distinta localización de ambos compuestos.
6. La permeabilización de membranas inducida por estos fármacos está modulada por la composición lipídica. Así, fosfolípidos como el fosfatidilglicerol y la fosfatidiletanolamina estabilizan la membrana frente a la permeabilización. Esta acción está causada por un aumento de las interacciones electrostáticas en la región de las cabezas polares, y por la formación de enlaces de hidrógeno, lo

que se traduce en membranas más cohesionadas, y por lo tanto más resistentes a la permeabilización.

7. La investigación llevada a cabo en esta tesis aporta información a escala molecular sobre el efecto del tamoxifeno y el 4-hidroxitamoxifeno en la estructura y función de membranas fosfolipídicas. Esta información puede ser relevante para explicar algunas de las acciones terapéuticas y/o efectos secundarios descritos para estos fármacos.

