

# **Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Tese de Doutorado

**O efeito da benfotiamina sobre enzimas alvo do ciclo de Krebs em cultura de células da linhagem 4T1**

Renata Campos Leão

**Uberaba**

**2021**

# **Universidade Federal do Triângulo Mineiro**

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

## **O efeito da benfotiamina sobre enzimas alvo do ciclo de Krebs em cultura de células da linhagem 4T1**

Renata Campos Leão

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte dos requisitos para obtenção do título Doutor em Ciências da Saúde área de concentração Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientador:** Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari

**Uberaba**

**2021**

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do  
Triângulo Mineiro**

L478e Leão, Renata Campos  
O efeito da benfotiamina sobre enzimas alvo do ciclo de Krebs em cultura de células da linhagem 4T1 / Renata Campos Leão. -- 2021.  
63 p. il.: fig., graf.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021  
Orientador: Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari  
Coorientadora: Profa. Dra. Márcia Antoniazzi Michelin

1. Neoplasias da mama. 2. Morte celular. 3. Tiamina. 4. Técnicas in vitro. I. Portari, Guilherme Vannucchi. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 618.19-006

# Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**O efeito da benfotiamina sobre enzimas alvo do ciclo de Krebs em  
cultura de células da linhagem 4T1**

Renata Campos Leão

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como parte dos requisitos para obtenção do título Doutor em Ciências da Saúde área de concentração Imunologia Básica e Aplicada.

## **Membros da Banca:**

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Márcia Antoniazzi Michelin  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro-UFTM

---

\_\_\_ Prof. Dr. Alexandre de Paula Rogerio  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM

---

Prof. Dr. Thomas Prates Ong  
Universidade de São Paulo – USP

---

Prof. Dr. Hélio Humberto Angotti Carrara  
Universidade

---

Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari  
Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

**Uberaba**

**2021**

*Dedico a todos que me acolheram durante o  
processo e confiaram no meu trabalho.*

## **AGRADECIMENTOS**

Peço licença aos leitores para agradecer de uma forma menos convencional e mais fiel aos sentimentos atuais. Nessa trajetória inúmeras pessoas passaram no meu caminho e todos, de alguma forma, me impulsionaram a persistir.

É impossível pensar em gratidão sem relembrar o início de tudo, por isso preciso começar os agradecimentos com meu orientador que, em 2014, conseguiu ouvir, auxiliar e incentivar uma garota recém formada em nutrição a entrar no mestrado e posteriormente no doutorado.

Gratidão especial aos meus colegas de jornada acadêmica e aos técnicos de laboratórios que trabalharam comigo, literalmente de perto entendendo que, por mais correto que tudo parecesse estar, á qualquer momento seria necessário uma dose extra de paciência e trabalho.

Agradeço ainda à Universidade Federal do Triângulo Mineiro pelo apoio e acolhimento desde de 2009 até os dias atuais, sendo que guardo em mim inúmeras histórias, conquistas, choros e dias cansativos, mas com muito aprendizado. Aos professores, colaboradores e examinadores eu sou imensamente grata a vocês pela paciência e tempo disponibilizado.

Estendo esse agradecimento ainda, aos meus pais, família, namorado e amigos pessoais que mesmo sem compreenderem completamente a dimensão burocrática envolvida durante todo o processo, sempre me apoiaram e tranquilizaram. Por fim, sou profundamente grata a todos os acontecimentos e por não desistir diante de toda a pressão que o momento atual (pandemia) exige. Encerro parafraseando Clarice Lispector: " sozinhos podemos até chegar mais rápido, mas acompanhados com certeza vamos mais longe". Muito obrigada.

*As raízes do estudo são amargas, mas seus frutos são doces.*

*Aristóteles*

## Resumo

**Introdução:** O metabolismo energético é uma das principais diferenças entre as células tumorais e normais, sendo que as células tumorais produzem energia preferencialmente pela glicólise anaeróbica em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial. Dentre as enzimas do metabolismo glicolítico, o complexo da piruvato desidrogenase, que está localizado na mitocôndria, requer alguns cofatores para catalisar a conversão de piruvato à acetil-coA. Um dos cofatores é a vitamina B1 que também é conhecida como tiamina. A benfotiamina é um análogo sintético da tiamina, possuindo uma biodisponibilidade superior. **Objetivo:** Investigar a influência da tiamina por meio de sua pro-forma, *i.e.*, a benfotiamina sobre o metabolismo energético das células tumorais e a morte celular programada em células de câncer mamário da linhagem 4T1. **Materiais e Métodos:** Para tanto, foram utilizadas células da linhagem 4T1 as quais são provenientes de câncer de mama de camundongo. Foram formados três grupos conforme a concentração de benfotiamina utilizada no meio de cultura, *i.e.*, Controle, Benfo50 (benfotiamina 50 $\mu$ mol/L) e Benfo100 (benfotiamina 100 $\mu$ mol/L). Cada grupo foi realizado em triplicatas e mantidos por 24 ou 72 horas exposto a benfotiamina (exceto o controle). **Resultados:** A concentração de lactato foi menor nos grupos com exposição a benfotiamina (24h e 72h). Os resultados de citometria demonstraram uma redução no número de células vivas nos grupos Bf50 e Bf100 comparados com o controle nos dois tempos. Maior número de células em apoptose inicial nos grupos expostos a benfotiamina durante 24 horas comparados com o controle, e de apoptose tardia nos dois nos grupos expostos a benfotiamina (24h e 72h) em todas as comparações. O número de células em necrose foi menor nos grupos que ficaram por um período de 24 horas do que o controle, mas a comparação entre Bf50, Bf100 e os tempos mostrou um maior percentual de células em necrose no período de 72 horas. O grupo Bf100 24h apresentou-se maior significativamente que o Bf100 72h em relação a tiamina. A comparação do grupo C 72h da TDP foi menor que o mesmo grupo em 24 horas. A comparação da razão de TMP/TDP apresentou-se maior no grupo C 72 horas do que o grupo C 24h. **Conclusão:** A exposição de uma linhagem celular de câncer a benfotiamina potencializa a via do complexo enzimático piruvato desidrogenase. Além disso, influencia na morte celular por apoptose e diminui o número de células em necrose no período de 24 horas. Novos estudos são válidos, posto a escassez de trabalhos na área, para avaliar os mecanismos desse análogo *in vitro* dentro da célula possibilitando o início do avanço de terapias específicas para um tipo de câncer de mama agressivo.

**Palavras chave:** *In vitro*. Tiamina. Morte celular. Câncer de mama.



## Abstract

**Introduction:** The energetic metabolism is one of the major differences between tumor and normal cells, of which tumor cells produce energy by anaerobic glycolysis preferably at the expense of mitochondrial oxidative phosphorylation. Among the enzymes of the glycolytic metabolism, the pyruvate dehydrogenase complex, which is located in the mitochondria, requires some cofactors to catalyze the conversion of pyruvate to acetyl-CoA. One of the cofactors is vitamin B1 which is also known as thiamine. Benfotiamine is a synthetic analogue of thiamine, having superior bioavailability. **Objective:** To investigate the influence of thiamine through its pro-forma, ie, benfotiamine on the energetic metabolism of tumor cells and programmed cell death in breast cancer cells of the 4T1 lineage. **Materials and Methods:** For this purpose, cells from the 4T1 lineage, which come from mouse breast cancer, were used. Three groups were formed according to the concentration of benfotiamine used in the culture medium, ie, Control, Benfo50 (benfotiamine 50 $\mu$ mol/L) and Benfo100 (benfotiamine 100 $\mu$ mol/L). Each group was performed in triplicate and kept for 24 or 72 hours exposed to benfotiamine (except the control). **Results:** The lactate concentration was lower in the groups exposed to benfotiamine (24h and 72h). Cytometry results showed a reduction in the number of living cells in the Bf50 and Bf100 groups compared to the control at both times. Greater number of cells in early apoptosis in the groups exposed to benfotiamine for 24 hours compared to the control, and in late apoptosis in both groups exposed to benfotiamine (24h and 72h) in all comparisons. The number of cells in necrosis was lower in the groups that stayed for a period of 24 hours than in the control, but the comparison between Bf50, Bf100 and the times showed a higher percentage of cells in necrosis in the period of 72 hours. The 24h Bf100 group was significantly higher than the 72h Bf100 in relation to thiamine. The comparison of group C 72h of TDP was less than the same group in 24 hours. The comparison of the TMP/TDP ratio was higher in the 72-hour C group than in the 24-hour C group. **Conclusion:** The exposure of a cancer cell line to benfotiamine potentiates the pathway of the pyruvate dehydrogenase enzymatic complex. Furthermore, it influences on cell death by apoptosis and decreases the number of cells undergoing necrosis within 24 hours. New studies are valid, given the scarcity of works in the area, to assess the mechanisms of this analogue in vitro inside the cell, enabling the beginning of the advance of specific therapies for an aggressive type of breast cancer.

**Keywords:** In vitro. Thiamine. Cell death. Breast cancer

## LISTA DE FIGURAS

### *Tese*

Figura 1.....30

### *Artigo 1*

Figura 1.....42

Figura 2.....42

Figura 3.....43

Figura 4.....44

Figura 5.....44

Figura 6.....45

Figura 7.....46

### *Artigo 2*

Figura 1.....58

Figura 2.....59

## LISTA DE ABREVIATURAS

- PDH** – Piruvato desidrogenase
- Acetil-coa** – Acetil coenzima A
- Dna** – ácido desoxirribonucleico
- RNA** – ácido ribonucleico
- ER** – Receptor de estrogênio
- PR** – Receptor de progesterona
- HER2** – receptor ERBB2
- MCP** – morte celular programada
- FS** – fosfatidilserina
- ATP** – Adenosina Trifosfato
- NAD<sup>+</sup>** –dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
- FAD** – flavina adenina dinucleotídeo
- CO<sub>2</sub>** – gás carbônico
- NADH** – dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido.;
- GDP** – difosfato de guanosina
- GTP** – trifosfato de guanosina
- T** – Tiamina
- TDP** – Tiamina difosfato
- TMP** – Tiamina trifosfato
- Pdha1** – Piruvato desidrogenase subunidade E1 alfa
- Pdhb** – Piruvato desidrogenase subunidade E1 beta
- Tkt** – Trancetolase
- Qrt-PCR** –Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
- T** – Tiamina
- TDP** – Tiamina difosfato
- TMP** – Tiamina trifosfato

## LISTA DE SIGLAS

**WHO** – World Health Organization

**INCA** – Instituto Nacional do Câncer

**IDH** – Índice de Desenvolvimento Humano

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS .....	11
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
<b>2.1. Câncer – aspectos gerais.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2. Células do carcinoma mamário 4t1 .....</b>	<b>18</b>
<b>2.3. Tipos de morte celular .....</b>	<b>19</b>
<b>2.4. Metabolismo, efeito warburg e ciclo de krebs .....</b>	<b>21</b>
<b>2.5. TIAMINA .....</b>	<b>23</b>
<b>2.6. BENFOTIAMINA.....</b>	<b>24</b>
3. HIPÓTESE.....	27
4. OBJETIVO GERAL .....	28
<b>4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>28</b>
5. JUSTIFICATIVA.....	29
6. METODOLOGIA .....	30
6.1. Delineamento experimental .....	30
<b>6.2. Quantificação de lactato.....</b>	<b>31</b>
<b>6.3. Quantificação de Expressão Gênica.....</b>	<b>31</b>
Extração do RNA Total.....	31
qRT-PCR.....	31
<b>6.4. Quantificação de produtos da glicólise e do ciclo de Krebs.....</b>	<b>32</b>
<b>6.5. Citometria de fluxo.....</b>	<b>33</b>
<b>6.6. Quantificação de tiamina.....</b>	<b>33</b>
7. Análise estatística.....	34
8. RESULTADOS PARCIAIS .....	35
<b>7.1. Artigo 1: O efeito da benfotiamina sob morte celular em linhagem de câncer de mama triplo negativo .....</b>	<b>35</b>
<b>7.2. Artigo 2: Metabolismo da benfotimina em uma linhagem celular de cancer de mama.....</b>	<b>53</b>
8. REFERÊNCIAS DA TESE .....	61

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública mundialmente conhecido e dentre os tipos existentes o mais frequente entre as mulheres é o câncer de mama. Segundo a *World Health Organization (WHO)*, a cada ano essa doença impacta cerca de 2,1 milhões de mulheres (“WHO | Breast cancer”, [s.d.]). No Brasil, esse câncer representa 29% dos casos que acometem as mulheres depois do câncer de pele não melanoma, correspondendo cerca de 25% dos casos novos a cada ano. Segundo as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) espera-se aproximadamente 66.280 novos casos de câncer de mama, para cada ano do triênio 2020-2022. Além disso, em 2019 o número de mortes foi de 18.295, configurando uma doença com altas taxas de mortalidade (“(INCA), I.N.C.A. Câncer de Mama”, [s.d.]).

Existem diferenças entre as células tumorais e células normais, porém o metabolismo energético é uma das principais, pois as células tumorais produzem energia preferencialmente pela glicólise anaeróbica. Em células normais a oxidação da glicose aeróbica conta com o auxílio do complexo enzimático piruvato desidrogenase (PHD) que promove a conversão de piruvato a Acetil coenzima A (acetil-CoA) (ALVES; BIESEK; GUERRA, 2005; PADOVANI et al., 2006). Dentre as enzimas do metabolismo glicolítico o complexo da PDH e o  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase necessitam de alguns cofatores para catalisar as reações, um dos cofatores enzimáticos é a vitamina B1, também conhecida como tiamina. Esta vitamina é hidrossolúvel e sua suplementação tem sido associada com a proliferação de tumores (LƯƠNG; NGUYỄN, 2013).

A benfotiamina é um análogo sintético da tiamina, possuindo uma biodisponibilidade superior, sendo que após sua ingestão, ela é desfosforilada e transformada em uma substância lipossolúvel, a benzoiltiamina. Por ser lipossolúvel, a benzoiltiamina, atravessa facilmente as membranas e é rapidamente absorvida, e então é levada ao fígado onde é transformada em tiamina para ser exportada a todas as células do organismo (POMERO et al., 2001b; PORTARI, 2013; SÁNCHEZ-RAMÍREZ et al., 2006).

Beltramo e colaboradores em 2004, verificaram a associação de tiamina e benfotiamina nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{mol/L}$  em células endoteliais

submetidas à altas concentrações de glicose. Nesse trabalho o autor encontrou que essas concentrações promovem a normalização da replicação celular, produção de lactato e formação de produtos de glicação avançada em células endoteliais bovinas (BELTRAMO et al., 2004b). Da mesma maneira, outro trabalho in vitro mostrou que depois de 24 horas do tratamento com tiamina e benfotimina separadamente em diferentes concentrações de glicose houve uma redução na proliferação celular (POMERO et al., 2001b).

Contribuindo para novas descobertas e terapias, a linhagem de células 4T1 tem sido muito utilizada em ensaios clínicos, pois trata-se de células que se assemelham com o quadro clínico de câncer de mama em humanos, ou seja, com a disseminação progressiva (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001; YOSHIMURA et al., 2013b). Essa linhagem foi transplantada de carcinoma mamário de um Balb/cfC3H e é capaz de proliferar em camundongos e em cultura de tecidos, além disso são células que após seu desenvolvimento podem ser removidas e analisadas facilmente (DEXTER et al., 1978).

Diante das características e funções do câncer de mama e da benfotiamina no metabolismo das células, é possível que a manipulação da concentração desse análogo in vitro exerça influência na expressão de enzimas atuantes no metabolismo glicolítico do câncer de mama da linhagem 4T1.

## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. Câncer – aspectos gerais

Um dos maiores problemas de saúde pública no mundo é a alta incidência de indivíduos diagnosticados com câncer. Essa doença é a segunda causa de morte no Brasil, podendo ultrapassar as doenças cardíacas (JEMAL et al., 2010). O câncer mais comumente diagnosticado entre mulheres em grande parte dos países do mundo é o de mama. Em países desenvolvidos esse tipo de câncer representa anualmente 25% dentre os demais tipos (BALDASSARRE; BELLETTI, 2016; DESANTIS et al., 2015; GHONCHEH; SOLTANI; SALEHINIYA, 2016). Nos países com maior Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), as taxas de incidência foram de duas a três vezes maiores que as dos países de médio ou baixo IDH, mas é válido ressaltar que para as mulheres, as taxas desse câncer predominam independentemente do IDH. Além disso, independentemente da condição socioeconômica do país, a incidência desse câncer se configura entre as primeiras posições das neoplasias malignas femininas (“(INCA), I.N.C.A. Câncer de Mama”, [s.d.]).

De acordo com dados do INCA, em 2017, 16.724 mulheres morreram por câncer de mama, o equivalente a um risco de 16,16 por 100 mil. Em 2018, ocorreram 2,1 milhões de casos novos, o equivalente a 11,6% de todos os cânceres estimados no Brasil, e em 2019 o número de mortes sofreu um aumento, sendo que 18.068 mulheres morreram de câncer de mama. Conseqüentemente o instituto calcula aproximadamente 66.280 novos casos desse tipo de câncer, para cada ano do triênio 2020-2022, representando uma taxa de incidência de 43,74 casos por 100 mil mulheres (“(INCA), I.N.C.A. Câncer de Mama”, [s.d.]).

Dentre os fatores que aumentam a incidência de câncer de mama, a idade é um dos principais, sendo que ao longo do envelhecimento ocorrem alterações fisiológicas acentuando os riscos de adquirir a doença. Além disso, fatores comportamentais, genéticos, menopausa tardia, menstruação precoce e obesidade também podem agravar o risco para essa doença. A ocorrência do câncer de mama é maior a partir dos 50 anos, sendo mais raro antes dos 35 anos. Dessa forma, a recomendação é que mulheres a partir de 20 anos devem realizar o auto-exame, orientadas por um médico, e mulheres assintomáticas de 40 a 70 anos devem realizar



o exame clínico, preferencialmente uma vez ao ano (SMITH et al., 2003; TORRE et al., 2015)

Uma doença degenerativa, o câncer de mama é influenciado por variações individuais, morfológicas, moleculares e ainda por fatores genéticos. Essas variações atuam sob o comportamento das células tumorais e da resposta ao tratamento (SENCHUKOVA et al., 2015). Contudo, é possível um bom prognóstico quando o diagnosticado é realizado precocemente, e então executado o tratamento. Os sinais e sintomas mais comuns do câncer de mama é o aparecimento dos nódulos, geralmente indolores. Além disso, edema cutâneo, dor, inversão do mamilo descamação e hiperemia também são sintomas dessa doença (CANÁRIO et al., 2016).

O processo de desenvolvimento do câncer envolve algumas teorias, que compreendem dois acontecimentos básicos, a alteração no material genético de células, e a divisão celular alterada com a passagem do material genético para as células filhas (COOPER; HAUSMAN, 2000). As células cancerosas possuem biomoléculas necessárias para a sobrevivência, proliferação, diferenciação, morte celular e expressão de funções específicas para cada tipo de célula. Em condições favoráveis, a modificação de uma célula normal para uma célula cancerosa necessita da ocorrência de várias alterações em seu material genético (HONG, 2010).

As células com câncer possuem a capacidade de desviar de sinais que podem prejudicar seu crescimento. Além disso, tem a capacidade de manipular o microambiente local ao seu favor, favorecendo o crescimento da metástase. O microambiente tumoral é composto de distintos tipos de células como os fibroblastos, células epiteliais, células do estroma, células imunes inatas (macrófagos, neutrófilos, células natural *Killer* e células dendríticas), células do sistema imune (linfócitos B e T) e matriz extracelular (DE VISSER; EICHTEN; COUSSENS, 2006; INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016a; PEIN; OSKARSSON, 2015). É no microambiente que ocorre a integração de todas as células envolvidas promovendo o desenvolvimento tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O câncer de mama possui uma grande diversidade celular e molecular, com variações em diferentes tumores, os quais possuem um número grande de genes comprometidos com o crescimento, diferenciação e morte celular (SØRLIE et al.,

2001). A maioria destes tumores são derivados das células luminais secretoras e células basais (BÖCKER et al., 2002). Com isso, o câncer de mama possui vários subtipos patológicos e diferentes aspectos histológicos (CALLAGY et al., 2003).

O câncer de mama é uma doença com um alto grau de heterogeneidade, suas variações histológicas referentes a expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e receptor ERBB2 (HER2) iniciou as bases para a classificação desse câncer. Além disso, uma subclassificação molecular permite dividir em luminal A, luminal B, superexpressor de HER2 e basaloide. Em resumo, o subtipo luminal A representa cerca de 60% dos casos e são tumores que apresentam RE e RP positivo e HER2 negativos. Os tumores do subtipo luminal B exibem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, e são caracterizados por expressarem genes associados ao HER2. Já o superexpressor de HER2 apresenta RE e RP negativos e HER2 positivo, o subtipo basaloide geralmente apresenta negatividade tanto para os receptores hormonais, quanto para o HER2, sendo um triplo negativo que enquadra no caso clínico mais agressivo quando comparado aos demais (YEO; GUAN, 2017).

Da mesma maneira que as divisões de acordo com a diferença histopatológica, existem subdivisões moleculares caracterizadas com o auxílio de tecnologias, essas identificam o ácido desoxirribonucleico (DNA), ácido ribonucleico (RNA) e perfil de proteínas do câncer de mama. Essas subdivisões se diferem e são importantes para guiar o prognóstico e os alvos terapêuticos no tratamento, porém essas diferenças moleculares sugerem que diversos tumores de mama ainda não foram descobertos (PEROU et al., 2000; SØRLIE, 2004).

## **2.2. Células do carcinoma mamário 4t1**

As células 4T1 foram originalmente isoladas de um câncer de mama de um Balb/cfC3H, por isso é uma linhagem celular de câncer mamário de camundongos. Essa linhagem tem sido muito utilizada, pois trata-se de um modelo que pode ser facilmente transplantado para glândulas mamárias em trabalhos experimentais, com animais, além disso, esse tumor após seu desenvolvimento pode ser removido e analisado por completo facilmente (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2000; YOSHIMURA et al., 2013a).

Somado a isso, outra característica desse tumor é sua semelhança ao câncer de mama humano avançado, uma vez que demonstra uma progressão de doença similar (SAYERS et al., 2014). O tumor mamário 4T1 se assemelha com o quadro clínico do câncer em humanos, ou seja, com a disseminação progressiva, pois ambos possuem eficiência em promover a metástase em sítios distintos, como, sangue, pulmões, cérebro e ossos (LI et al., 2014b, p. 1). Somada a expansão de trabalhos com essa linhagem em camundongos BALB/c, a mesma também consegue proliferar *in vitro*, possuindo ainda a vantagem de ser uma linhagem de fácil manipulação dentro de laboratórios específicos (PULASKI; OSTRAND-ROSENBERG, 2001, p. 1).

### **2.3. Tipos de morte celular**

A morte celular não deve ser classificada somente como sinônimo de patologia, sendo que a manutenção dos organismos multicelulares depende da interação entre as células que o constituem. Dessa maneira, a morte celular refere-se ainda a um processo fundamental para o desenvolvimento normal, pois acontece desde a formação do início da vida, *i.e.* embriogênese. Em 1965, foi estabelecido o conceito de morte celular programada (MCP) por Lockshin e Williams, essa descoberta foi a partir de insetos seguindo a teoria do “manual de construção”, sugerindo que as células possuíam mecanismos controlados de morte e que esse evento não ocorria acidentalmente (COHEN, 1991; LINDEN, 2004; LOCKSHIN; WILLIAMS, 1965)

A MCP pode acontecer sem nenhuma perturbação externa, ou seja, como resposta fisiológica de renovação tecidual, ou simplesmente em resposta natural ao desenvolvimento. Além disso, essa morte pode ocorrer por uma desordem no microambiente promovendo um estresse no organismo sem as repostas adaptativas necessárias que geram a homeostase celular (GALLUZZI et al., 2018a). O desenvolvimento da MCP a partir de alterações morfológicas pode ser classificado em três tipos como: autofagia, apoptose e necrose.

A autofagia pode ocorrer de forma adaptativa e controlada geneticamente, sendo um processo pelo qual as células reciclam suas próprias organelas e componentes macromoleculares não essenciais, redundantes ou danificados. Esse tipo de MCP ocorre em resposta a um estresse metabólico e durante seu

desenvolvimento porções do citoplasma são encapsuladas por membrana, originando estruturas denominadas autofagossomos que então se funde com os lisossomos e posteriormente o conteúdo dos autofagossomos é degradado pelas hidrolases lisossomais (HOTCHKISS et al., 2009).

Apresentada para a ciência a partir de 1970 por Kerr e colaboradores, a apoptose, é um fenômeno oposto a mitose, com características de desenvolvimento que podem ser iniciadas ou inibidas por uma variedade de estímulos fisiológicos ou patológicos (GALLUZZI et al., 2018a; KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972b). O termo apoptose (do grego *apoptosis*, significa “queda”) pode ocorrer por diferentes vias e genes, caracterizada por acometer células individualizadas, pois a morte de uma não acarreta a morte de outras células, além disso, esse processo pode ocorrer no meio de células saudáveis.

A caracterização da MCP por apoptose passa por algumas alterações, sendo possível visualizar o encolhimento do citoplasma, condensação da cromatina (picnose) e fragmentação do núcleo e da membrana celular, além da formação dos corpos apoptóticos. O mecanismo molecular da apoptose passa por fases como a ativação das caspases, grupo de proteases que possuem cisteínas, com a posterior execução dessas proteases, levando à apoptose (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972a; TOWER, 2015).

Para a ativação das caspases é necessário que ocorra uma série de eventos celulares, inicialmente, é durante a via intrínseca que alguns estímulos dentre eles, o estresse oxidativo, é capaz de alterar o equilíbrio celular favorecendo moléculas pro-apoptóticas a agirem sobre a permeabilidade da membrana mitocondrial. Posteriormente na via extrínseca acontece a sinalização por meio de receptores transmembrana com um potencial de sinalização, denominado “receptores da morte”, sendo capazes de enviarem sinais para dentro das células ativando as caspases (BOHM, 2003; HOTCHKISS et al., 2009; TOWER, 2015).

Além da fase conhecida como execução da apoptose que leva a ativação das caspases, atividades enzimáticas auxiliares também são capazes de gerar a degradação do núcleo e de proteínas do citoplasma, cumprindo o programa de morte celular (OLIVER; VALLETTE, 2005). Dentre os marcadores existentes para identificar um tipo de morte celular como apoptose a anexina V é uma proteína que possui a

capacidade de ligação a fosfolipídios de membrana. Durante a apoptose, ocorre a externalização da fosfatidilserina (FS) da membrana celular além de outras alterações celulares. A inversão da FS da face interna para a face externa da membrana plasmática é um evento precoce da apoptose (VERMES et al., 1995) .

Independente do estágio da apoptose (molecular ou celular), a mitocôndria desenvolve um papel extremamente importante sendo capaz de determinar se a célula entrará em via apoptótica (OLIVER; VALLETTE, 2005). Em contrapartida a morte celular por apoptose, regulada e programada, a necrose é caracterizada como uma morte acidental, desregulada e necessariamente associada à um processo patológico. Além disso, seu desenvolvimento resulta na perda precoce da membrana, desnaturação proteica, digestão enzimática da célula e obstrução vascular levando a danos no tecido, somado a uma falha metabólica e rápida depleção de Adenosina Trifosfato (ATP)(KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972a).

#### **2.4. Metabolismo, efeito warburg e ciclo de krebs**

As células tumorais são metabolicamente adaptadas para crescerem e proliferarem mesmo em condições desfavoráveis, nas quais as células normais não cresceriam ou não conseguiriam sobreviver (GRIFFITHS, 2001). Somado a isso, o metabolismo energético é uma das principais diferenças entre as células tumorais e normais. A glicose é uma fonte primordial de energia para as células, fornecendo não apenas ATP, mas também metabólitos para diferentes vias.

As células tumorais produzem energia preferencialmente pela glicólise anaeróbica em detrimento da fosforilação oxidativa mitocondrial, ou seja, ocorre o crescimento do tumor mesmo sob condições limitadas de disponibilidade de oxigênio (MORENO-SÁNCHEZ et al., 2007). Em células normais o piruvato derivado da glicólise é oxidado a Acetil coenzima A (acetil-CoA) com o auxílio do complexo enzimático piruvato desidrogenase (PHD). Essa oxidação do acetil-CoA inicia o ciclo do Krebs, ou ciclo do ácido cítrico que é composto por uma cadeia de reações, compostas por 8 etapas.

A função primordial desse ciclo é extrair toda a energia do acetil-CoA. O complexo PDH que é fundamental para iniciar a primeira etapa do ciclo de Krebs é formado por três enzimas: desidrogenase pirúvica, dihidrolipoiltranscetilase e dihidrolipoildesidrogenase e cinco coenzimas: tiamina difosfato (TDP), lipoamida, coenzima A, dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado (NAD<sup>+</sup>) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD). Durante a primeira etapa do ciclo de Krebs, o oxalacetato recebe o grupo acetil do acetil-CoA, ocorrendo a saída da coenzima A do processo e, então, a reação possui energia suficiente para a formação do citrato, sendo essa reação catalisada pela enzima citrato-sintase (PATEL; KOROTCHKINA, 2003; RARDIN et al., 2009).

A segunda e terceira etapas são compostas pela formação do isocitrato e posteriormente na conversão dele em alfa-cetoglutarato, em uma descarboxilação oxidativa catalisada pela isocitrato-desidrogenase. Nesse processo ocorre a primeira perda de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) e produção de NADH. Durante o quarto passo, também ocorre a saída do CO<sub>2</sub> e do NADH, pois ocorre a conversão do alfa-cetoglutarato a succinil-CoA, catalisada pela alfa-cetoglutarato-desidrogenase. Seguindo, durante a próxima etapa o succinil-CoA é convertido a succinato, nesse processo a saída da coenzima A torna possível a união de um fosfato inorgânico com um difosfato de guanossina (GDP) produzindo energia suficiente para a produção de uma molécula de trifosfato de guanossina (GTP).

Posteriormente, o succinato sofre uma desidrogenação, produzindo uma molécula de FADH<sub>2</sub> e fumarato. A enzima fumarase promove a conversão do fumarato a malato. Este é convertido a oxaloacetato pela ação da enzima malato-desidrogenase. Neste último passo, acontece a produção de mais uma molécula de NADH. As moléculas de NADH e FADH<sub>2</sub> produzidas durante o ciclo de Krebs fornecem significativa quantidade de elétrons à fosforilação oxidativa. Assim, apesar de não ser um grande produtor direto de ATP, cada acetil-CoA oxidado no ciclo de Krebs é um importante precursor de energia (PATEL; KOROTCHKINA, 2003; RARDIN et al., 2009). Em contraste a esse metabolismo que ocorre nas células normais, a maioria das células cancerígenas apresentam alterações no metabolismo da glicose (INSUA-RODRÍGUEZ; OSKARSSON, 2016b)

Otto Warburg, descreveu pela primeira vez na década de 20 um fenômeno metabólico que compreende em comparar o metabolismo das células normais e tumorais. Neste fenômeno, as células cancerígenas apresentam elevadas e desreguladas taxas de consumo de glicose e de produção de lactato, sendo resultado de alterações genéticas que ocorrem no processo do tumor, principalmente durante as transformações celulares (WARBURG, 1956a). Esse processo é considerado um sinal metabólico de tumores agressivos e ficou conhecido como "Efeito Warburg" (LU; TAN; CAI, 2015a; WARBURG, 1956a). Dessa maneira, a oferta de energia para os processos biológicos envolvidos na manutenção, desenvolvimento e proliferação das células tumorais ocorrem do consumo glicose até a produção de ATP, sendo necessário o bom funcionamento das enzimas do metabolismo glicolítico (MACHEDA; ROGERS; BEST, 2005b; VANDER HEIDEN, 2011b).

Dentre as enzimas do metabolismo glicolítico o complexo da PDH que está localizado na mitocôndria requer alguns cofatores para catalisar a conversão de piruvato a acetil-coA. Um dos cofatores é a TDP que é derivada da vitamina B1 que também é conhecida como tiamina. A enzima específica tiamina pirodifosfoquinase promove a conversão das formas livre e monofosfatadas (TMP) da tiamina em TDP que é a forma fisiologicamente ativa. Além disso, a TDP atua como coenzima na atividade da  $\alpha$ -cetoglutarato desidrogenase, enzima responsável pela descarboxilação do  $\alpha$ -cetoglutarato dentro do metabolismo energético. Assim como, a tiamina também é importante para a atividade normal da transcetolase, enzima reguladora da via das pentoses fosfato, essencial para recuperação e manutenção dos tecidos, sendo seus principais produtos a NADPH<sup>+</sup> e a ribose 5 fosfato (BELTRAMO et al., 2008a; BOLAÑOS et al., [s.d.]).

## **2.5. TIAMINA**

A tiamina, também conhecida como vitamina B1 foi a primeira vitamina do complexo B descoberta. Ela é essencial em etapas iniciais do metabolismo aeróbio da glicose (e alguns aminoácidos) para a formação do ATP que todas as células do corpo utilizam como fonte de energia (PORTARI, 2013). Essa vitamina não é sintetizada no organismo dos mamíferos, por isso sua ingestão e boa absorção de

alimentos fontes é importante, tais como grãos integrais, carnes (especialmente a de porco), vegetais, castanhas, legumes e frutas (ALVES; BIESEK; GUERRA, 2005).

A deficiência de tiamina pode estar relacionada com o consumo excessivo de bebidas alcoólicas ou dietas restritivas. Os sintomas da deficiência incluem dor de cabeça, náuseas, fadiga muscular, irritabilidade, depressão e desconforto abdominal, os quais afetam principalmente os sistemas nervoso e cardiovascular (PORTARI, 2013). A recomendação de consumo alimentar dessa vitamina é de 1,2 mg/dia para homens e 1,1 mg/dia para mulheres com idade entre 19 a 50 anos (PADOVANI et al., 2006). Quando a ingestão dos alimentos fontes de tiamina é insuficiente, ocorre uma deficiência intracelular e o metabolismo energético é prejudicado (CHOI; BAEK; CHOI, 2013).

As estruturas biologicamente presentes da tiamina são a própria tiamina livre, as formas fosfoesterificadas TMP, TDP, tiamina trifostato (TTP) e trifostato de adenosil de tiamina (PÁCAL; KURICOVÁ; KAŇKOVÁ, 2014). A tiamina livre e a TMP circulantes no plasma sob condições normais são ligadas a albumina. Quando a capacidade de ligação da albumina é saturada o excesso é rapidamente filtrado pelo glomérulo e excretado na urina. Embora uma quantidade significativa de tiamina recém-absorvida seja fosforilada no fígado, todos os tecidos podem captar tanto tiamina livre quanto TMP sendo capazes de fosforilar para TDP e TTP (BENDER, 2003).

## **2.6. BENFOTIAMINA**

O desenvolvimento do câncer envolve teorias que compreendem dois acontecimentos básicos, a alteração no material genético de células e a divisão celular alterada com a passagem do material genético para as células filhas (COOPER; HAUSMAN, 2000). A compreensão do tumor somente como um conjunto de células neoplásicas levando a metástase foi entendido pela literatura científica como insuficiente. Dessa forma, a análise mais aprofundada sobre tumores específicos como o câncer de mama, o qual atinge inúmeras mulheres é necessário.



A tiamina é hidrossolúvel e sua suplementação tem sido associada com a proliferação do tumor (LU'ONG; NGUYỄN, 2013). Em um estudo experimental, o autor observou que doses 25 vezes acima da recomendação de tiamina, quando injetadas sete dias antes da inoculação do tumor, resultou no aumento de 22% no crescimento tumoral. Quando essa mesma dose é administrada a partir de quatro dias após a inoculação tumoral, este efeito na proliferação é muito mais baixo. Além disso, este estudo encontrou que, diferente do primeiro achado, com a administração de doses muito acima do remendado, cerca de 2500 vezes houve a inibição de 36% do tumor. Dessa maneira, este estudo concluiu que as adequações de deficiências de tiamina só trariam benefício se doses muito elevadas fossem fornecidas (COMÍN-ANDUIX et al., 2001).

A suplementação com um análogo de tiamina, a benfotiamina, em uma condição classicamente sabida ser causadora de deficiência desta vitamina, *i.e.*, o alcoolismo. Verificou-se uma biodisponibilidade muito superior de tiamina nos animais que ingeriram benfotiamina em relação à ingestão de tiamina, o que resultou em concentrações de tiamina nos eritrócitos 25 vezes maior no grupo que recebeu benfotiamina (PORTARI, 2013). A benfotiamina é um análogo sintético da tiamina. Após sua ingestão, ela é defosforilada no lúmen intestinal por fosfatases inespecíficas transformando-se em uma substância lipossolúvel, a benzoiltiamina. Por ser lipossolúvel, a benzoiltiamina atravessa facilmente as membranas e é rapidamente absorvida e levada ao fígado onde é transformada em tiamina para ser exportada a todas as células do organismo, sendo assim mais biodisponível (POMERO et al., 2001b; PORTARI, 2013; SÁNCHEZ-RAMÍREZ et al., 2006).

Beltramo et al. (2004), verificaram a associação de tiamina e benfotiamina nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{mol/L}$  em células endoteliais submetidas à altas concentrações de glicose. Neste trabalho o autor encontrou que essas concentrações promovem a normalização da replicação celular, redução na produção de lactato e formação de produtos de glicação avançada em células endoteliais bovinas (BELTRAMO et al., 2004b). Da mesma maneira, outro trabalho *in vitro* mostrou que depois de 24 horas do tratamento com tiamina e benfotimina separadamente em diferentes concentrações de glicose reduziu ligeiramente a proliferação celular (POMERO et al., 2001b). Diante às características e funções da benfotiamina no metabolismo das células saudáveis e tumorais, é possível que a manipulação da

concentração desse análogo in vitro exerça influência nos processos de proliferação celular com consequente ação no metabolismo glicolítico.

Dessa maneira, o trabalho explora o efeito da exposição de tiamina por meio de sua pro-forma, *i.e.*, a benfotiamina, sobre enzimas alvo no ciclo de Krebs em cultura de células da linhagem 4T1 com possibilidade de alteração fenotípica para aerobiose.

### **3. HIPÓTESE**

O fornecimento suplementar de tiamina, via sua pro-forma (benfotiamina) para células da linhagem 4T1 aumenta a expressão e atividade de enzimas alvo do ciclo de Krebs.

#### **4. OBJETIVO GERAL**

Investigar a influência da benfotiamina em aumentar a expressão e atividade de enzimas alvo do ciclo de Krebs em células de câncer mamário da linhagem 4T1.

#### **4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar o ciclo celular após exposição a benfotiamina;

Avaliar alteração do metabolismo energético das células tumorais por meio de expressão gênica de enzimas chave e quantificação de metabólitos;

Avaliar a morte celular, qualificando-a.

## 5. JUSTIFICATIVA

Diante das evidências científicas já esclarecidas, incluindo a maior biodisponibilidade da benfotiamina que às outras formas de tiamina e de alguns estudos mostrarem que a benfotiamina tem influência sobre o metabolismo aeróbio da glicose (glicólise e ciclo de krebs) para prover substratos para a produção de ATP via fosforilação oxidativa (BELTRAMO et al., 2004a, 2008b; POMERO et al., 2001a; PORTARI; VANNUCCHI; JORDAO JR, 2013).

Considerando ainda, que as células tumorais possuem adaptações em seu microambiente, acarretando elevadas e desreguladas taxas de consumo de glicose e de produção de lactato (WARBURG, 1956b). Existem poucas associações científicas dos tipos de morte celular com a benfotiamina, principalmente em um subtipo agressivo e com poder metastático (câncer de mama triplo negativo).

Posto isso, os achados desse estudo poderão dar início aos esclarecimentos sobre os efeitos e funções da benfotiamina no metabolismo das células tumorais, verificando se é possível que a manipulação da concentração desse análogo in vitro exerça influência no metabolismo glicolítico com consequente ação nos processos de morte celular podendo ser utilizado como um tratamento adjuvante para o câncer de mama triplo negativo.

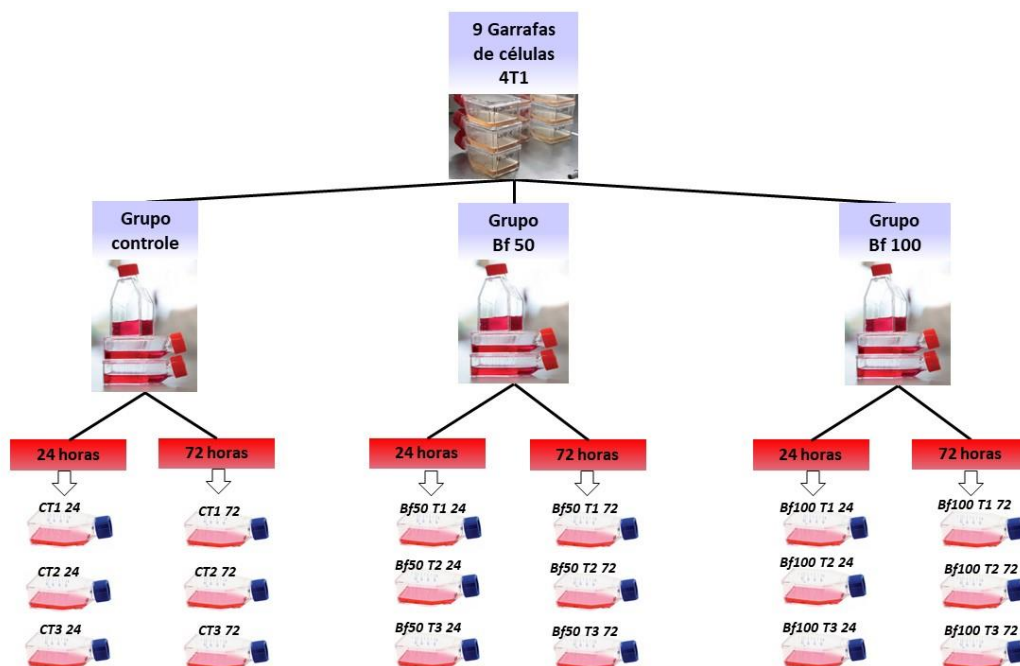
## 6. METODOLOGIA

### 6.1. Delineamento experimental

Foram utilizadas células da linhagem 4T1 as quais são provenientes de câncer de mama de camundongo e que possuem características equivalentes ao câncer de mama triplo negativo humano. As células 4T1 foram mantidas em garrafas de 15mL com meio RPMI completo de pH 7.4 com CO<sub>2</sub> 5% a 37°C.

Depois de formados três grupos conforme a concentração de benfotiamina utilizada no meio de cultura, *i.e.*, controle, contendo o diluente da benfotiamina, Benfo50 (benfotiamina 50µmol/L) e Benfo100 (benfotiamina 100µmol/L), cada grupo foi dividido em triplicatas e mantidos por 24 ou 72 horas exposto a benfotiamina (exceto o controle) no meio de cultura RPMI completo. Após o período correto de incubação as células foram recolhidas para posteriores análises.

Figura 1 Delineamento experimental



Legenda: Grupo controle: grupo sem exposição a benfotiamina. Grupo Bf50: grupo exposto a uma concentração de 50µmol/L de benfotiamina; Grupo Bf100: grupo exposto a uma concentração de 100µmol/L de benfotiamina. CT1 24: Controle triplicata 1 mantida por 24h; CT2 24: Controle triplicata 2 mantida por 24h; CT3 24: Controle triplicata 3 mantida por 24h; CT1 72: Controle triplicata 1 mantida por 72h; CT2 72: Controle triplicata 2 mantida por 72h; CT3 72: Controle triplicata 3 mantida por 72h; Bf50 T1 24: 50µmol/L de benfotiamina triplicata 1 mantida por 24h; Bf50 T2 24: 50µmol/L de benfotiamina triplicata 2 mantida por 24h; Bf50 T3 24: 50µmol/L de benfotiamina triplicata 3 mantida por 24h; Bf50 T1 72: 50µmol/L de benfotiamina triplicata 1 mantida por 72h; Bf50 T2 72: 50µmol/L de

benfotiamina triplicata 2 mantida por 72h; Bf50 T3 72: 50 $\mu$ mol/L de benfotiamina triplicata 3 mantida por 72h; Bf100 T1 24: 50 $\mu$ mol/L de benfotiamina triplicata 1 mantida por 24h; Bf100 T2 24: 50 $\mu$ mol/L de benfotiamina triplicata 2 mantida por 24h; Bf100 T3 24: 50 $\mu$ mol/L de benfotiamina triplicata 3 mantida por 24h; Bf100 T1 72: 50 $\mu$ mol/L de benfotiamina triplicata 1 mantida por 72h; Bf100 T2 72: 50 $\mu$ mol/L de benfotiamina triplicata 2 mantida por 72h; Bf100 T3 72: 50 $\mu$ mol/L de benfotiamina triplicata 3 mantida por 72h.

## 6.2. Quantificação de lactato

O lactato é gerado como um subproduto da glicólise anaeróbica e foi medido para fornecer informações sobre o tipo de geração de energia. Para a quantificação de lactato foi necessário o sobrenadante das células com a adição de 1 $\mu$ M de 6-aminonicotinamida (ANAM), inibidor da via das pentoses. Estas células foram cultivadas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino sem a presença de vermelho de fenol para evitar a sua interferência na absorção de luz a 340 nm. O lactato foi quantificado através do kit lactato liquiform (Bioclin).

## 6.3. Quantificação de Expressão Gênica

### Extração do RNA Total

Foi avaliado o nível de expressão de RNA das enzimas piruvato desidrogenase (Pdha1 e Pdhb) e transcetolase (Tkt), através da técnica de Transcrição Reversa-Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa (qRT-PCR) em tempo real.

Para tanto, o RNA foi extraído utilizando método de extração fenol-clorofórmio descrito por Chomczynski & Sacchi (1987). O RNA total foi quantificado em espectrofotômetro e a absorbância medida nos comprimentos de onda de 260, 280 e 230 nm, visando avaliação do grau de pureza. Cada unidade de densidade óptica (DO) equivale a 40  $\mu$ g de RNA por mL de solução, sendo que a concentração de RNA total foi expressa em ng/ $\mu$ L. Para preservação do RNA, alíquotas das amostras de RNA foram armazenadas em nitrogênio líquido.

### qRT-PCR

Os genes alvo das enzimas analisadas foram quantificados por Reação em Cadeia da Polimerase via Transcriptase Reversa em tempo real (qRT-PCR). Para realização do qRT-PCR é necessário a síntese do DNA complementar (DNAC) a partir

do RNA extraído do tecido. O cDNA foi sintetizado por meio de transcrição reversa, a partir de 2µg de RNA total do tecido muscular dos camundongos utilizando-se TaqMan® RNA-to-CT™ 1-Step Kit e *primers* específicos, obtidos através do *GenBank* ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) (NCBI–NIH, Bethesda, EUA).

As reações de qRT-PCR foram realizadas em duplicata, utilizando como método de detecção o TaqMan®, em um aparelho StepOne™ System. Os níveis relativos de transcritos foram determinados utilizando-se 18S RNA ribossômico (18S rRNA) como o gene constitutivo. A termociclagem iniciará após incubação da solução a uma temperatura de 50°C por 2 minutos. Em seguida, a temperatura foi elevada até 95°C para dissociação das fitas de DNA, e então reduzida a 60°C para anelamento dos *primers*. A temperatura foi então elevada a 72°C, para otimizar a atividade da Taq polimerase. Este ciclo foi repetido por 40 vezes.

Antes dos procedimentos, os *primers* foram submetidos a ensaios para otimização dos mesmos, assim como a quantidade de cDNA necessária para as reações de quantificação dos transcritos. Curvas padrão foram pré-determinadas para cada transcrito a fim de definir o valor do limiar de detecção (*threshold*), onde cada reação apresentasse eficiência de torno de 100%. Para a análise da qPCR, foi aplicado o método  $\Delta\Delta C_t$  a fim de realizar comparação com o grupo controle (calibrador).

#### **6.4. Quantificação de produtos da glicólise e do ciclo de Krebs**

A análise de valores para produtos da glicólise, intermediários do ciclo de Krebs e corpos cetônicos foi realizada em amostras de cada cultura de células utilizando cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) com detecção tanto no modo de varredura como no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM) em um GC-MS Shimadzu QP-5000, segundo metodologia descrita por Hur *et al.* (2014). Para a derivação das amostras das diferentes culturas de células foram maceradas sobre banho ultrassônico. Após isso, água destilada (500 µL), acetonitrila (500 µL) e padrão interno (PI) (0,2 µg) foram adicionados à alíquota de homogenato e a mistura foi submetida a agitação em vórtex (2 min) e centrifugadas (14.000 rpm durante 10 min) para precipitar as proteínas.



O sobrenadante foi ajustado a pH 12 com NaOH 5,0 M. Os grupos carbonila foram convertidos em derivados metoxima (MO), por reação com hidrocloreto de metoxiamina (1,0 mg) a 60°C durante 30 min. A mistura de reação foi então acidificada a pH 1-2 com uma solução de ácido sulfúrico a 10% saturada com cloreto de sódio e extraída com éter dietílico (3 mL) seguido por acetato de etilo (2 mL).

Após a adição de trietilamina (5 µL), os extratos combinados foram evaporados até à secura sob uma corrente suave de nitrogênio (40°C). Adiciona-se aos resíduos tolueno (20 µl) como solvente e N-metil-N-(tert-butildimetilsilil) trifluoroacetamida (MTBSTFA)+1% tert-butildimetilclorosilano (20 µL) como o reagente de sililação seguido de aquecimento a 60°C durante 30 min para formar derivados metoxima/terc-butildimetilsililo para análise no GC-SIM-MS.

## 6.5. Citometria de fluxo

A citometria de fluxo foi realizada utilizando um kit comercial (Cayman Chemical Annexin V FITC assay kit) para determinar morte celular. Após tratadas, as células foram recolhidas, contadas e distribuídas em tubos antes de sofrerem centrifugação a 805xg por cinco minutos e o sobrenadante descartado. Foi realizada uma lavagem com o tampão de ligação proveniente do kit e centrifugado novamente, e o sobrenadante descartado. Posteriormente as células foram suspensas em 50 µL de anexina V (AN), FITC/iodeto de propídeo (PI) e incubadas no escuro por 10 minutos. 150 µL de tampão de ligação foi adicionado e as amostras analisadas pelo citometro utilizando 488nm de excitação e 525nm de emissão para FITC e 655-730 de emissão para P.I.

## 6.6. Quantificação de tiamina

A concentração de tiamina foi analisada nas amostras com adição de 200 µL de água destilada e posterior congelamento rápido em nitrogênio líquido e descongelada três vezes consecutivas para a hemolise. Em seguida, foi adicionado 0,8 M perclóricoácido (1: 1 vol) e centrifugado a 5000 rpm por 10 min a 4 ° C para

desproteínização. Foram coletados 80  $\mu$ L do sobrenadante e adicionados 50  $\mu$ L de hexacianoferrato de potássio 30 mM ( $K_3Fe(CN)_6$ ) e 50  $\mu$ L de hidróxido de sódio 0,8 M (NaOH) para derivatização. A solução foi misturada com 20  $\mu$ L de metanol, e 20  $\mu$ L foram injetados no cromatógrafo (Shimadzu LC-10AT - Shimadzu Instruments, Kyoto, Japão). As análises foram realizadas por uma fase móvel composta por 70 volumes de tampão fosfato 25 mM (pH 7,0), metanol e acetonitrila (7: 2: 1 vol), coluna cromatográfica C18 (Agilent, Sigma-Aldrich) e fluxo em 1,0ml / min. O detector fluorométrico (Shimadzu RF-20A - Shimadzu Instruments) foi ajustado em 365 nm para excitação e 435 nm para emissão. A concentração de tiamina e seus ésteres (TMP e TDP) foi normalizada pela concentração total de hemoglobina na amostra.

## 7. Análise estatística

Todos os dados foram tabulados em planilhas e analisados utilizando as ferramentas estatísticas do *graphpad prism* versão 8.0. Para verificar a distribuição dos dados da curva gaussiana, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Após a constatação da normalidade na distribuição dos dados, foi utilizado análise de variância de um fator (ANOVA *one way*) e post hoc de Tukey para comparar os resultados de expressão gênica. Nas comparações de concentração de lactato, citometria de fluxo e quantificação de tiamina foi utilizado análise de variância de dois fatores (ANOVA *two way*) e aplicado o teste de bonferroni. Foram considerados significantes os resultados com valores de 95% ( $p < 0,05$ ).

## 8. RESULTADOS PARCIAIS

### 7.1. Artigo 1: *O efeito da benfotiamina sob morte celular em linhagem de câncer de mama triplo negativo*

**Situação:** *Submetido no Journal Anti-Cancer Agents Medicinal Chemistry*



Renata Campos Leao Renata Leao <renataleaonutricionista@gmail.com>

---

#### Submission Notification to co-author | BMS-ACAMC-2021-147

1 mensagem

---

**Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry** <admin@bentham.manuscriptpoint.com> 15 de março de 2021 às 11:18  
Responder a: Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry <acamc@benthamscience.net>  
Para: renataleaonutricionista@gmail.com  
Cc: acamc@benthamscience.net, sahar@benthamscience.net

Dear Dr. Renata Campos Leão,

This is with reference to an article entitled: "EFFECT OF BENFOTIAMINE ON CELL DEATH IN A TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER CELL LINE" which has been submitted for possible publication in Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry, and in which you are listed as one of the co-authors.

The manuscript has been submitted to the journal by Guilherme Portari who is listed as the main author and who will be authorized to track the status of the paper after login.

If you have any objections to this submission, then please contact the editorial office as soon as possible by replying to this email. If we do not hear back from you within one week, we will assume you agree with your co-authorship.

Thank you very much.

Ms.Sahar Iftkhar  
Manager  
Bentham Science Publishers  
E-mail: [sahar@benthamscience.net](mailto:sahar@benthamscience.net)

Bentham Science is constantly striving to improve its publication practices. If you are not satisfied with any procedure of the processing of your manuscript, then please let us know at the following email address with full details:

Note: For Assistance please contact: [info@benthamscience.net](mailto:info@benthamscience.net)

For complaints please contact: [complaint@benthamscience.net](mailto:complaint@benthamscience.net)

To unsubscribe from MPS and stop receiving emails further. Please send an email to [unsubscribe@bentham.manuscriptpoint.com](mailto:unsubscribe@bentham.manuscriptpoint.com).

Powered by [Bentham Manuscript Processing System](#)

## EFFECT OF BENFOTIAMINE ON CELL DEATH IN A TRIPLE NEGATIVE BREAST CANCER CELL LINE

Renata Campos Leão<sup>a</sup>, Álisson de Carvalho Gonçalves<sup>a</sup>, Jéssica Ferreira Vieira<sup>b</sup>, Ediee Cândido Murta<sup>b</sup>, Márcia Antoniazzi Michelin<sup>b</sup>, Guilherme Vannucchi Portari<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Experimental Nutrition, Health Sciences Institute, Federal University of Triangulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil.

<sup>b</sup>Oncology Research Institute, Federal University of Triangulo Mineiro Uberaba, MG, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Nutrition, Health Sciences Institute, Federal University of Triangulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil.

### Abstract

This study aims to evaluate the influence of exposure of a cancer cell line to benfotiamine on cell death. 4T1 cells line were used and three groups were formed according to the concentration of benfotiamine used, *i.e.*, Control, Bf50 (benfotiamine 50 $\mu$ mol/L) and Bf100 (benfotiamine 100 $\mu$ mol/L). Each group was performed in triplicates and maintained for 24 or 72 hours exposed to benfotiamine (except the control). The lactate concentration was determined with the cell supernatant after treatment. The gene expression of key enzymes in glycolytic metabolism was analyzed using the qRT-PCR technique and the ability to relate cell viability and type of cell death was based on flow cytometry analysis. The results showed that the lower lactate concentration in lower the groups with exposure to benfotiamine (24h and 72h). The expression of the target genes in the glycolytic metabolism of the samples that remained for 24 hours did not reveal significant effects. The cytometry results showed a reduction in the number of live cells in the Bf50 and Bf100 groups compared to the control in the two times. Higher number of cells in initial apoptosis in the groups exposed to benfotiamine for 24 hours compared to the control, and of late apoptosis in both groups exposed to benfotiamine (24h and 72h) in all comparisons. The number of cells in necrosis was lower in the groups that stayed for a period of 24 hours than the control, but the comparison between Bf50, Bf100 and the times showed a higher percentage of cells in necrosis in the period of 72 hours. Exposure of a cancer cell line

to benfotiamine potentiates the enzymatic complex. pyruvate dehydrogenase pathway by decreasing lactate, increasing the number of cells in early and late apoptosis and decreasing the number of cells in necrosis within 24 hours. However, exposure to benfotiamine does not seem to affect the gene expression pattern of thiamine-dependent enzymes.

**Key words:** Benfotiamine; Thiamine; Apoptosis; 4T1; Cell death.

**Introduction:**

Vitamin B1, also known as thiamine, is a water-soluble substance and it can be found in the organism in its free form or phosphoesterified forms: thiamine monophosphate (TMP), thiamine diphosphate (TDP), thiamine triphosphate (TTP) and thiamine adenosyl triphosphate (PÁCAL; KURICOVÁ; KAŇKOVÁ, 2014; PORTARI; VANNUCCHI; JORDAO JR, 2013). Benfotiamine after dephosphorylated by nonspecific phosphatases forming benzoylthiamine becomes a fat-soluble analog with greater bioavailability than thiamine. This form of derivation when administered orally increases the levels of thiamine in the blood and, consequently, the levels of TDP in the tissues, when compared to water-soluble salts<sup>2-4</sup>.

Thiamine, in its active form, *i.e.*, TDP is an essential cofactor for aerobic glucose metabolism (glycolysis and Krebs cycle) to provide substrates for the production of adenosine triphosphate (ATP) via oxidative phosphorylation (BELTRAMO et al., 2008b; BOLAÑOS et al., 2008).

Tumor cells have high and unregulated rates of glucose consumption and lactate production due to adaptations in an anaerobic microenvironment<sup>7-11</sup>. Some *in vitro* studies have shown a relationship between different concentrations and times of administration of benfotiamine on glycolytic metabolism, resulting in reduced lactate production and normalized cell replication (BELTRAMO et al., 2008b; POMERO et al., 2001a).

Programmed cell death (MCP) can occur due to a disorder in the microenvironment promoting stress in the body without the necessary adaptive responses that generate cell homeostasis. The characterization of MCP by apoptosis goes through phases such as: the activation of caspases, a group of proteases that have cysteines, with the subsequent execution of these proteases, leading to apoptosis<sup>13-15</sup>.

For the activation of caspases, it is necessary that a series of cellular events occur. Initially, in the intrinsic pathway, some stimuli, such as oxidative stress, are able to alter the cellular balance favoring pro-apoptotic molecules to act on the permeability of the mitochondrial membrane. Subsequently, in the extrinsic pathway, signaling occurs through transmembrane receptors with a signaling potential, called “death

receptors”, being able to send signals into cells, activating caspases(BOHM, 2003; HOTCHKISS et al., 2009; TOWER, 2015).

In addition to the phase known as the execution of apoptosis, which leads to the activation of caspases, auxiliary enzyme activities are also capable of generating the degradation of the nucleus and proteins of the cytoplasm, fulfilling the program of cell death(OLIVER; VALLETTE, 2005). In contrast to cell death due to apoptosis, which is regulated and programmed, necrosis is characterized by early loss of the membrane, protein denaturation, enzymatic digestion of the cell and vascular obstruction leading to tissue damage, coupled with metabolic failure and rapid depletion of ATP(KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972a).

Among the existing markers to identify a type of cell death, annexin V is a protein that precedes the loss of membrane integrity that accompanies the last stages of cell death by apoptotic or necrotic processes, having the capacity to bind to membrane phospholipids(VERMES et al., 1995). The 4T1 breast cancer cell line does not have specific targeted therapies, being an aggressive subtype with a high rate of recurrent metastasis and are not treatable by hormonal therapies(MENDES; KLUSKENS; RODRIGUES, 2015).

In view of the characteristics and functions of benfotiamine in the metabolism of healthy and tumor cells, it is possible that the manipulation of the concentration of this analog in vitro has an influence on glycolytic metabolism with consequent action in the processes of cell death and can be used as an adjuvant treatment for cancer triple negative breast.

## **Materials and methods:**

### ***Cell culture:***

The 4T1 cells, from the Oncology Research Institute, were kept in 15mL bottles with complete RPMI medium pH 7.4, at 5% CO<sub>2</sub> and at 37°C, then the cells were counted and relocated in three groups, in triplicates, according to the concentration of benfotiamine used in the culture medium, *i.e.*, Control, containing the diluent (RPMI medium) of benfotiamine, Bf50 (benfotiamine 50µmol / L) and Bf100 (benfotiamine 100µmol / L). Subsequently, the groups were divided and kept in a greenhouse for 24 or 72 hours.

After treatment and exposure to benfotiamine, cells were washed in saline solution, collected and counted, being divided between flow cytometry and gene expression analyzes. The supernatant was intended for lactate analysis.

### ***Cell death***

The cells free of medium, without the supernatant and after centrifugation (805xg) were resuspended in 200 µL of buffer from the commercial kit (Cayman Chemical Annexin V FITC assay kit) and, discarding the supernatant. Subsequently, the cells were suspended in 50 µL of annexin V (AN), FITC / propidium iodide (PI) and incubated in the dark for 10 minutes. And then 150 µL of binding buffer was added and the samples analyzed by the cytometer using 488nm excitation and 525nm emission for FITC and 655-730 emission for PI.

### ***Gene expression***

For gene expression analysis, cells were washed with 1x PBS, removing excess culture medium, then centrifuged (805xg) and stored in trizol in the -80°C freezer. Subsequently, for the analysis of the gene of the component E1-alpha subunit of the PDH complex (PDHa1), of the gene E1-beta subunit (PDHb) and transcetolase (Tkt), the quantitative Polymerase Reverse Transcription-Chain Reaction (qRT) technique was used -PCR) in real time, with the constitutive Rn18s gene. The total RNA was extracted from the cells of the control group and the groups exposed to benfotiamine. The total RNA was converted to cDNA by the High Capacity cDNA-to-RNA kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. PCR was performed using 2 µL of cDNA, 10 µL of TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems), 7 µL of



91 nuclease distilled water and 1  $\mu$ L of TaqMan® Gene Expression Assay. The reactions were performed on a 7900HT real-time PCR instrument (Applied Biosystems).

### ***Quantification of lactate***

To determine the amount of lactate, was necessary the cell supernatant with the addition of 1 $\mu$ M 6-aminonicotinamide (ANAM), inhibitor of the pentose pathway. Subsequently, lactate was quantified using the lactate liquiform kit (Bioclin) following the manufacturer's instructions.

### ***Statistical analysis***

All data were tabulated in spreadsheets and analyzed using the statistical tools of graphpad prism version 8.0. To verify the distribution of data from the Gaussian curve, the Shapiro-Wilk test was applied. After verifying the normality in the data distribution, one-way analysis of variance (ANOVA one way) and Tukey's post hoc analysis was used to compare the results of gene expression. In the comparisons of lactate concentration and flow cytometry, two-way analysis of variance (ANOVA two way) was used and the bonferroni test was applied. Results with values of 95% ( $p < 0.05$ ) were considered significant.

## **Results:**

### ***Cell death***

Comparisons of the number of viable cells with non-viable cells for 24 hours (figure 1A) showed a higher percentage in group C (69% vs. 30%,  $p < 0.05$ ), the Bf50 group (60% vs. 39%,  $p < 0.05$ ) and the Bf100 group (54% vs. 46%,  $p < 0.05$ ). In the same way in figure 1B, all groups showed significantly higher numbers of viable cells when compared to non-viable cells, except Bf100, being represented by the following values: group C (65% vs. 34%,  $p < 0.05$ ), group Bf50 (53% vs. 46%,  $p < 0.05$ ) and Bf100 group (45% vs. 52%,  $p < 0.05$ ).

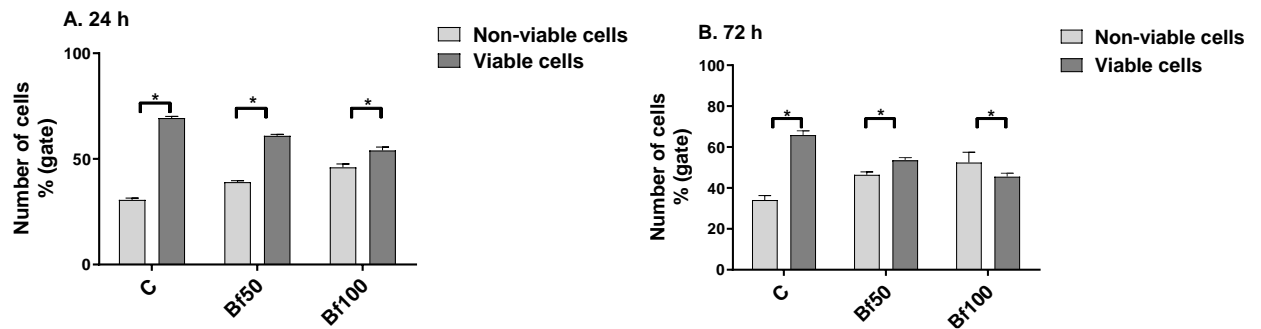


Figure 1. Comparisons of number of cells. A. 24 hours. B. 72 hours C = group control; Bf50 = benfotiamine 50µmol / L; Bf100 benfotiamine 100µmol / L. \*  $p < 0.05$

In relation to figure 2, the negative cells labeling for the annexin-V (AN) and propidium iodide (PI), refer to the number of living cells in all groups. Among the 24-hour groups, group C was greater than both Bf50 (69% vs. 60%,  $p < 0.05$ ) and Bf100 (69% vs. 54%,  $p < 0.05$ ) when analyzed within 24 hours, as well as the Bf50 was significantly lower than Bf100 (60% vs. 54%,  $p < 0.05$ ).

The comparison between the times, shown in the graph by the letters (a, b, c), the group C 72h, Bf50 72h and Bf100 72h were smaller than the groups 24 hours, being represented respectively: (65% vs. 69%,  $p < 0.05$ ), (53% vs. 60%,  $p < 0.05$ ) and (45% vs. 54%,  $p < 0.05$ ).

Likewise, in the 72-hour groups the group C was higher than both Bf50 (65% vs. 53%,  $p < 0.05$ ) and Bf100 (65% vs. 45%,  $p < 0.05$ ), in addition, Bf50 was lower than Bf100 (53% vs. 45%,  $p < 0.05$ ).

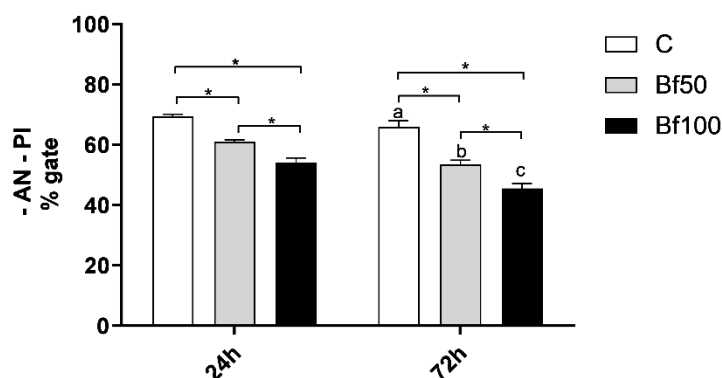


Figure 2. Live cells. C = group control; Bf50 = benfotiamine 50µmol / L; Bf100 benfotiamine 100µmol / L. a: comparison between group C; b: comparison between group Bf50; c: comparison between group Bf100 \*  $p < 0.05$

Cells on initial apoptosis, those are, AN positive cells are shown in Figure 3. Among the groups that remained for 24 hours, group C was smaller than both Bf50 (2% vs. 14%,  $p < 0.05$ ) and Bf100 (2% vs. 18%,  $p < 0.05$ ), but the comparison between the groups exposed to benfotiamine were not different. In contrast, the analysis of the 72 hour Bf100 group was lower when compared to the 24 hour Bf100 group (8% vs. 18%,  $p < 0.05$ ).

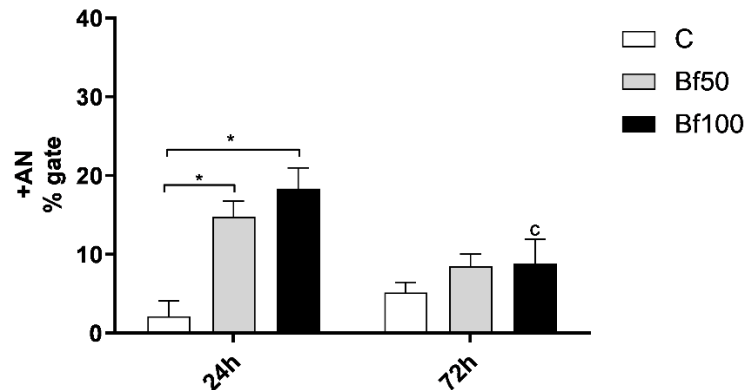


Figure 3. Initial apoptosis. C = group control; Bf50 = benfotiamine 50 $\mu$ mol / L; Bf100 benfotiamine 100 $\mu$ mol / L. \*: comparison between group Bf100 \*  $p < 0.05$

In relation to figure 4, which represents the positive cells for AN and PI, *i.e.*, late apoptosis, group C showed less than both Bf50 (4.6% vs. 8.6%,  $p < 0.05$ ) and Bf100 (4.6% vs. 11.3%,  $p < 0.05$ ) when analyzed in 24h, as well as Bf50 was significantly lower than Bf100 (8.6% vs. 11.3% ,  $p < 0.05$ ). Likewise, the groups analyzed in 72 hours, the C group was also less than both Bf50 (7.7% vs. 13.5%,  $p < 0.05$ ) and Bf100 (7.7% vs. 20.5%,  $p < 0.05$ ), in the same way, Bf50 was significantly lower than Bf100 (13.5% vs. 20.5%,  $p < 0.05$ ).

Regarding the comparison between the times, the C 72h, Bf50 72h and Bf100 72h groups were significantly higher than the 24h groups, being represented respectively: (7.5% vs. 4.6%,  $p < 0.05$ ), (13.5% vs. 8.6%,  $p < 0.05$ ) and (20.5% vs. 11.3%,  $p < 0.05$ ).

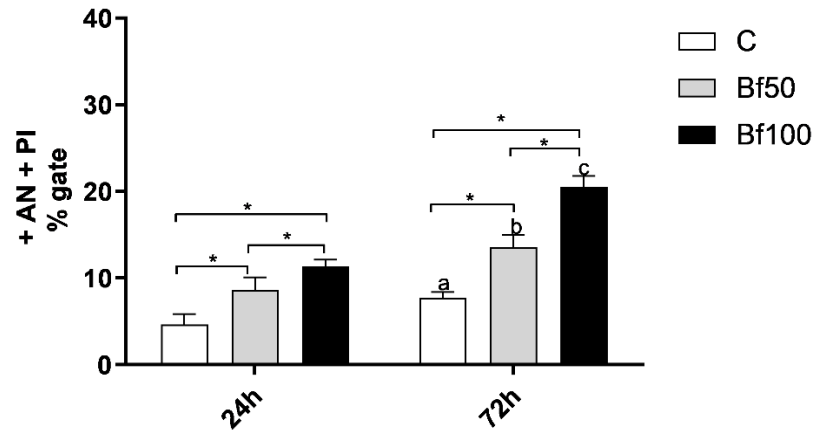


Figure 4. Late apoptosis. C = group control; Bf50 = benfotiamine 50 $\mu$ mol / L; Bf100 benfotiamine 100 $\mu$ mol / L. a: comparison between group C; b: comparison between group Bf50; c: comparison between group Bf100 \*  $p < 0.05$

Positive cells for PI staining only represent necrotic cells (Figure 5). The analyzes in the 24-hour group showed that group C showed a significantly higher value than both Bf50 (23.8% vs. 15.7%,  $p < 0.05$ ) and Bf100 (23.8% vs. 16.3%  $p < 0.05$ ), but the comparison between the Bf50 and Bf100 groups did not show significant differences. When analyzed in the same group at different times, the 72h Bf50 was higher than the 24h Bf50 (24.4% vs. 15.7%  $p < 0.05$ ) and the Bf100 72h, higher than the Bf50 24h (25.5% vs. 16.3%  $p < 0.05$ ). The comparisons between the different groups for 72 hours were not significant.

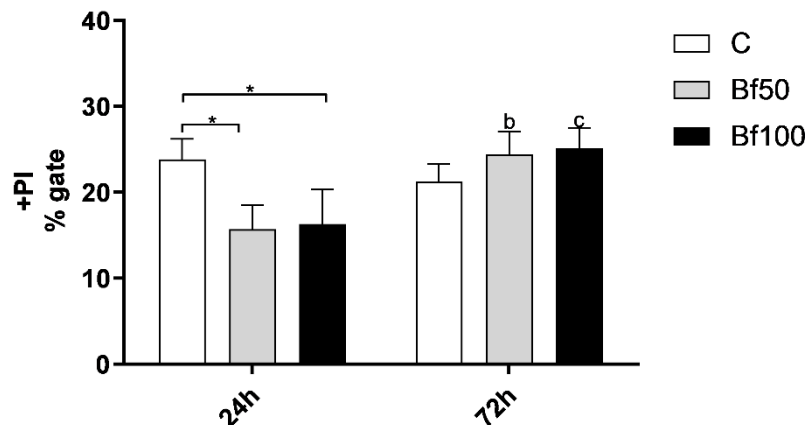


Figure 5. Necrotic cells. C = group control; Bf50 = benfotiamine 50 $\mu$ mol / L; Bf100 benfotiamine 100 $\mu$ mol / L. b: comparison between group Bf50; c: comparison between group Bf100 \*  $p < 0.05$

### **Gene expression**

The analyzes of gene expression (figure 6) referring to Pdha1 did not show any significant difference when comparing group C with Bf50 (1.02 vs.1.36,  $p > 0.05$ ) and Bf100 (1.02 vs. 0.37,  $p > 0.05$ ), as well as there were no differences between the Bf50 (1.02) and Bf100 (0.37) groups.

Likewise, the comparison between group C (1.06), Bf50 (1.46) and Bf100 (0.70) for the expression of the Pdhb gene, did not show significant values. Finally, the comparison of group C for the expression of the Tkt gene did not differ significantly from Bf50 (2.19vs. 2.99,  $p > 0.05$ ) Bf100 (2.19 vs. 0.35,  $p > 0.05$ ), as well as there were no differences between the Bf50 (2.19) and Bf100 (0.35) groups. The data referring to samples that remained for 72 hours were not presented, as the expression of the genes in question was not detected.

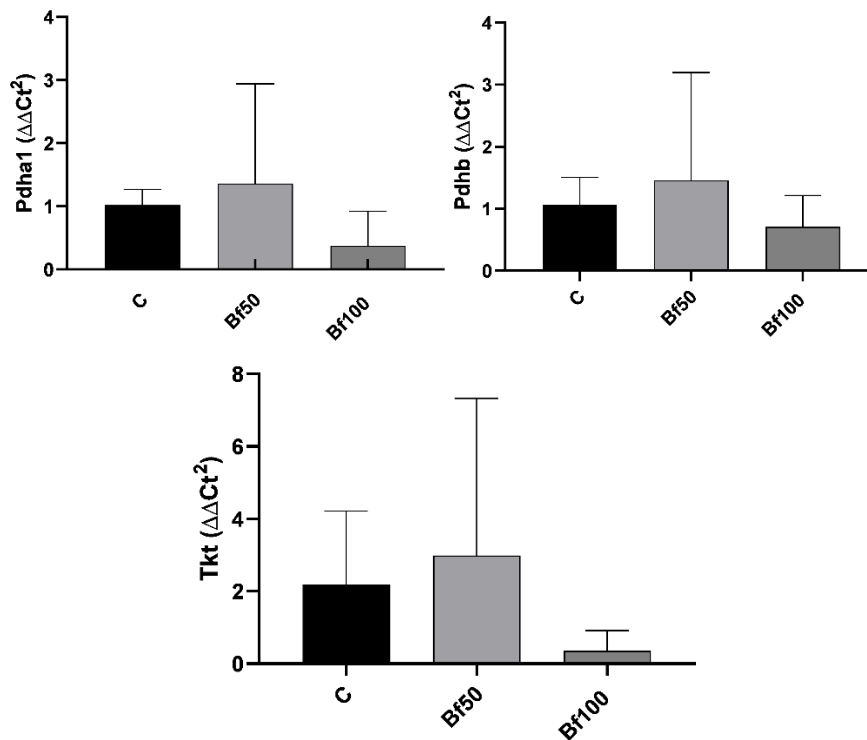


Figure 6. Comparison of expression gene pdh Pdha1, pdhb and Tkt between 24-hour

### **Quantification of lactate**

The lactate concentrations of the different groups and times are shown in figure 7. Group C was higher than both Bf50 (8.45 vs. 6.76  $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0.05$ ) and Bf100 (8.45 vs. 7.37  $\mu\text{mol/L}$ ,  $p < 0.05$ ) when analyzed in 24h. For the 72 hours, there was only a

difference ( $p < 0.05$ ) between C ( $6.99 \mu\text{mol/L}$ ) and Bf100 ( $5.45 \mu\text{mol/L}$ ). When analyzed in the same group, only Bf100 showed a decrease in lactate concentrations ( $p < 0.05$ ).

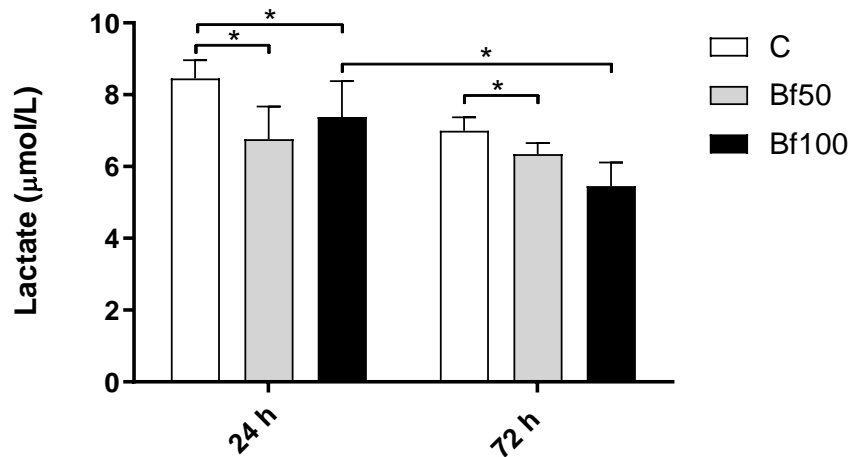


Figure 7. Comparisons of lactate concentrations. C = group control; Bf50 = benfotiamine  $50 \mu\text{mol/L}$ ; Bf100 benfotiamine  $100 \mu\text{mol/L}$ . \*  $p < 0.05$

## Discussion:

The present study aimed to evaluate the influence of exposure of a triple negative breast cancer cell line to benfotiamine on cell death.

In general, benfotiamine did not show cytotoxicity in the 24h period demonstrated by cell viability, whereas, in 72h, there was greater cell death in a dose dependent manner. In fact, the presence of benfotiamine in the culture medium induced death by apoptosis, which is more pronounced in 24 hours and moving to final stages in 72 hours, also with dose-dependency characteristics.

Although to a lesser extent, the presence of necrotic cells was observed in both periods and may be the result of normally non-viable cells.

It was not possible to demonstrate an increase in the expression of TDP-dependent enzymes although there was a tendency to increase in both three when using  $50 \mu\text{mol/L}$  of benfotiamine in the 24h period. A possible explanation is the fact that the cells are already present in the early stages of apoptosis, which would already lead to a lack of control of the genetic machinery. This hypothesis corroborates the fact that we were unable to quantify the mRNA in the 72-hour groups.

Similarly, the lactate released into the culture medium decreased for the 72h period. Although it can be understood, in a first analysis, as a decrease in the anaerobic pathway, in view of the other findings, we believe that it is an effect of decreasing the activity of the total energy metabolism, whatever it may have been.

This study, to our knowledge, is the first to evaluate the use of benfotiamine in 4T1 cells. Although preliminary (in vitro), it opens the way for more elaborate *in vivo* evaluations, with expanded possibilities to investigate more deeply the mechanisms involved in the induction of apoptosis and can be a promising adjuvant treatment for the type of cancer in question.

### **Conclusion:**

In view of our findings, we conclude that the in vitro use of benfotiamine causes the induction of cell death by apoptosis in a triple negative breast cancer cell line.

### **References:**

ALVES, L. A.; BIESEK, S.; GUERRA, I. Estratégias de nutrição e suplementação no esporte. **São Paulo**, 2005.

BALDASSARRE, G.; BELLETTI, B. Molecular biology of breast tumors and prognosis. **F1000Research**, v. 5, 2016.

BAST JR, R. C.; HOLLAND, J. F.; III, E. F. **Holland-Frei cancer medicine 8**. [s.l.] PMPH-USA, 2010. v. 8

BELTRAMO, E. et al. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 20, n. 4, p. 330–336, 2004a.

BELTRAMO, E. et al. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 20, n. 4, p. 330–336, jul. 2004b.

BELTRAMO, E. et al. Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. **Acta Diabetol**, p. 11, 2008a.

BELTRAMO, E. et al. Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. **Acta diabetologica**, v. 45, n. 3, p. 131, 2008b.

BETTENDORFF, L. The compartmentation of phosphorylated thiamine derivatives in cultured neuroblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1222, n. 1, p. 7–14, maio 1994.

- BÖCKER, W. et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 6, p. 737–746, 2002.
- BOHM, I. Apoptosis: The Complex Scenario for a Silent Cell Death. **Molecular Imaging & Biology**, v. 5, n. 1, p. 2–14, jan. 2003.
- BOLAÑOS, J. P. et al. Regulation of glycolysis and pentose–phosphate pathway by nitric oxide: Impact on neuronal survival. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1777, n. 7–8, p. 789–793, 2008.
- BOLAÑOS, J. P. et al. Regulation of glycolysis and pentose–phosphate pathway by nitric oxide: Impact on neuronal survival. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 5, [s.d.].
- CALLAGY, G. et al. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 12, n. 1, p. 27–34, 2003.
- CANÁRIO, A. C. G. et al. Physical activity, fatigue and quality of life in breast cancer patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 1, p. 38–44, 2016.
- CANCARINI, I. et al. Micronutrients Involved in One-Carbon Metabolism and Risk of Breast Cancer Subtypes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138318, 16 set. 2015.
- CHOI, S.-K.; BAEK, S.-H.; CHOI, S.-W. The effects of endurance training and thiamine supplementation on anti-fatigue during exercise. **Journal of exercise nutrition & biochemistry**, v. 17, n. 4, p. 189, 2013.
- COHEN, J. J. Programmed cell death in the immune system. **Advances in immunology**, v. 50, p. 55–85, 1991.
- COMÍN-ANDUIX, B. et al. The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 15, p. 4177–4182, 2001.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The cell**. [s.l.] Sinauer Associates Sunderland, 2000. v. 85
- DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature reviews cancer**, v. 6, n. 1, p. 24–37, 2006.
- DESANTIS, C. E. et al. International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 24, n. 10, p. 1495–1506, 2015.
- DEXTER, D. L. et al. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. **Cancer research**, v. 38, n. 10, p. 3174–3181, 1978.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018a.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018b.
- GHONCHEH, M.; SOLTANI, S.; SALEHINIYA, H. Disparities in Incidence and Mortality of Breast Cancer. **Iranian journal of public health**, v. 45, n. 2, p. 270–271, 2016.



GRIFFITHS, J. Causes and consequences of hypoxia and acidity in tumour microenvironments. **Bioessays**, v. 23, n. 3, p. 295–296, 2001.

HAMMES, H.-P. et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 3, p. 294–299, mar. 2003.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.

HONG, W. K. **Holland-Frei Cancer Medicine 8**. [s.l.] PMPH-USA, 2010. v. 8

HOTCHKISS, R. S. et al. Cell death. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 16, p. 1570–1583, 2009.

**(INCA), I.N.C.A. Câncer de Mama**. , [s.d.]. Disponível em:

<[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer\\_mama](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama)>.

Acesso em: 9 jan. 2018

INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 41–55, 2016a.

INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 41–55, 2016b.

JEMAL, A. et al. CA: a cancer journal for clinicians. **Cancer statistics**, v. 60, n. 5, p. 277–300, 2010.

JONUS, H. C. et al. Thiamine mimetics sulbutiamine and benfotiamine as a nutraceutical approach to anticancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 121, p. 109648, jan. 2020.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, ago. 1972a.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972b.

LI, Y. et al. Small-sized polymeric micelles incorporating docetaxel suppress distant metastases in the clinically-relevant 4T1 mouse breast cancer model. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 329, 10 maio 2014a.

LI, Y. et al. Small-sized polymeric micelles incorporating docetaxel suppress distant metastases in the clinically-relevant 4T1 mouse breast cancer model. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, dez. 2014b.

LINDEN, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 9, p. 1638–1650, 2004.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death—I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm. **Journal of insect physiology**, v. 11, n. 2, p. 123–133, 1965.

- LONSDALE, D. et al. The potential of lipid soluble thiamine in the treatment of cancer. **AIMS Biophysics**, v. 7, n. 1, p. 17–26, 2020.
- LU, J.; TAN, M.; CAI, Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. **Cancer letters**, v. 356, n. 2, p. 156–164, 2015a.
- LU, J.; TAN, M.; CAI, Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. **Cancer letters**, v. 356, n. 2, p. 156–164, 2015b.
- LU'ONG, K. V. Q.; NGUYỄN, L. T. H. The Role of Thiamine in Cancer: Possible Genetic and Cellular Signaling Mechanisms. **CANCER GENOMICS**, p. 17, 2013.
- MACHEDA, M. L.; ROGERS, S.; BEST, J. D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 202, n. 3, p. 654–662, 2005a.
- MACHEDA, M. L.; ROGERS, S.; BEST, J. D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 202, n. 3, p. 654–662, mar. 2005b.
- MENDES, T. F. S.; KLUSKENS, L. D.; RODRIGUES, L. R. Triple Negative Breast Cancer: Nanosolutions for a Big Challenge. **Advanced Science**, v. 2, n. 11, p. 1500053, nov. 2015.
- MORENO-SÁNCHEZ, R. et al. Energy metabolism in tumor cells. **The FEBS journal**, v. 274, n. 6, p. 1393–1418, 2007.
- OLIVER, L.; VALLETTE, F. M. The role of caspases in cell death and differentiation. **Drug Resistance Updates**, v. 8, n. 3, p. 163–170, jun. 2005.
- PÁCAL, L.; KURICOVÁ, K.; KAŇKOVÁ, K. Evidence for altered thiamine metabolism in diabetes: Is there a potential to oppose gluco- and lipotoxicity by rational supplementation? **World journal of diabetes**, v. 5, n. 3, p. 288, 2014.
- PADOVANI, R. M. et al. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, 2006.
- PATEL, M. S.; KOROTCHKINA, L. G. The biochemistry of the pyruvate dehydrogenase complex. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 31, n. 1, p. 5–15, 2003.
- PEIN, M.; OSKARSSON, T. Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 309, n. 10, p. C627–C638, 2015.
- PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.
- POMERO, F. et al. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. **Acta diabetologica**, v. 38, n. 3, p. 135–138, 2001a.
- POMERO, F. et al. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. **Acta Diabetologica**, v. 38, n. 3, p. 135–138, 1 set. 2001b.

PORTARI, G. V. Liver, plasma and erythrocyte levels of thiamine and its phosphate esters in rats with acute ethanol intoxication: A comparison of thiamine and benfotiamine administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 4, 2013.

PORTARI, G. V.; VANNUCCHI, H.; JORDAO JR, A. A. Liver, plasma and erythrocyte levels of thiamine and its phosphate esters in rats with acute ethanol intoxication: A comparison of thiamine and benfotiamine administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 799–802, 2013.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Current protocols in immunology**, v. 39, n. 1, p. 20–2, 2000.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. In: COLIGAN, J. E. et al. (Eds.). . **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

RARDIN, M. J. et al. Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex. **Analytical biochemistry**, v. 389, n. 2, p. 157–164, 2009.

SÁNCHEZ-RAMÍREZ, G. M. et al. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. **European Journal of Pharmacology**, p. 6, 2006.

SAYERS, K. T. et al. Increased Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) Production by Highly Metastatic Mouse Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104223, 11 ago. 2014.

SENCUKOVA, M. A. et al. Different types of tumor vessels in breast cancer: morphology and clinical value. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 512, 2015.

SHOEB, M.; RAMANA, K. V. Anti-Inflammatory Effects of Benfotiamine are Mediated Through the Regulation of Arachidonic Acid Pathway in Macrophages. **Free radical biology & medicine**, v. 52, n. 1, p. 182–190, 1 jan. 2012.

SMITH, R. A. et al. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 53, n. 3, p. 141–169, 2003.

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

SØRLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European journal of cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667–2675, 2004.

The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. p. 6, 2001.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TOWER, J. Programmed cell death in aging. **Ageing research reviews**, v. 23, p. 90–100, 2015.

VANDER HEIDEN, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. **Nature reviews Drug discovery**, v. 10, n. 9, p. 671–684, 2011a.

VANDER HEIDEN, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 671, 31 ago. 2011b.

- VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, jul. 1995.
- WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956a.
- WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956b.
- WHO | Breast cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>>. Acesso em: 12 mar. 2020.
- YEO, S. K.; GUAN, J.-L. Breast cancer: multiple subtypes within a tumor? **Trends in cancer**, v. 3, n. 11, p. 753–760, 2017.
- YOSHIMURA, T. et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells. **PLoS one**, v. 8, n. 3, p. e58791, 2013a.
- YOSHIMURA, T. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCL2 Produced by Stromal Cells Promotes Lung Metastasis of 4T1 Murine Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58791, 18 mar. 2013b.

## Acknowledgments

This research was supported by Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) [grant number: APQ-00039-15] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant number: 423171/2016-0].

## 7.2. Artigo 2: Metabolismo da benfotimina em uma linhagem celular de cancer de mama

Situação: *Submetido no Journal Experimental Oncology*



Renata Campos Leao Renata Leao <renataleao@nutricionista@gmail.com>

### Submission short communications

Renata Campos Leao Renata Leao <renataleao@nutricionista@gmail.com>  
Para: exponcol@gmail.com

19 de junho de 2021 às 00:25

Dear Editor,

On behalf of all the authors, I would like to ask you to consider our manuscript entitled, "**METABOLISM OF BENFOTIMINE IN A BREAST CANCER CELL LINE**" for publication in the *Experimental Oncology* as an short communications. This manuscript consists of 5 text pages, 5 figures.

We certify that this manuscript is original, has not been previously published or submitted elsewhere for publication, is not under consideration by another journal, and will not be submitted elsewhere until we have received your final decision. All of the authors participated equally in this study and agreed to the content of this paper. None of the authors have any financial or other relationships that could lead to a conflict of interest.

All related correspondence should be sent to:

Guilherme Vannucchi Portari, PhD

Department of Nutrition, Health Sciences Institute, Federal University of Triangulo Mineiro, Brazil

Rua Getúlio Guaritá, 159 - sala 333

CEP: 38025-440 - Uberaba – MG. Brazil.

Phone: +55 (34) 3318-5920

Thank you for your kind consideration of our manuscript and we look forward to hearing from you.

Yours sincerely,

Renata Leão



Livre de vírus. [www.avast.com](http://www.avast.com).

#### 2 anexos

**Main article.docx**  
23K

**Figures.docx**  
64K

## **METABOLISM OF BENFOTIMINE IN A BREAST CANCER CELL LINE**

Renata Campos Leão<sup>a</sup>, Álisson de Carvalho Gonçalves<sup>a</sup>, Jéssica Ferreira Vieira<sup>b</sup>, Eddie Cândido Murta<sup>b</sup>, Márcia Antoniazi Michelin<sup>b</sup>, Guilherme Vannucchi Portari<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Experimental Nutrition, Health Sciences Institute, Federal University of Triangulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil. Correspondence: E-mail:

[renataleaonutricionista@gmail.com](mailto:renataleaonutricionista@gmail.com); [alisoncg88@hotmail.com](mailto:alisoncg88@hotmail.com).

<sup>b</sup>Oncology Research Institute, Federal University of Triangulo Mineiro Uberaba, MG, Brazil. Correspondence: E-mail: [jescaferreira@gmail.com](mailto:jescaferreira@gmail.com);

[eddiemurta@mednet.com.br](mailto:eddiemurta@mednet.com.br); [marcia.michelin@uftm.edu.br](mailto:marcia.michelin@uftm.edu.br);

<sup>c</sup>Departament of Nutrition, Health Sciences Institute, Federal University of Triangulo Mineiro, Uberaba, MG, Brazil. Correspondence: E-mail:

[guilherme.portari@uftm.edu.br](mailto:guilherme.portari@uftm.edu.br)

## Abstract

**Introduction:** Benfotiamine (S-benzoylthiamine O-monophosphate) is a synthetic derivative that after ingestion the molecule is dephosphorylated in the intestine by nonspecific phosphatases making it liposoluble, it becomes thiamine diphosphate (TDP) which acts as a cofactor enzyme at Krebs cycle. Tumor cells have a metabolism for energy that is predominantly anaerobic. In this work we aimed to evaluate the metabolism of benfotiamine in a 4T1 cell culture. **Methods:** Cells from the 4T1 lineage were used and divided into three groups according to the concentration of benfotiamine using the culture medium, ie, control, Bf50 (benfotiamine 50 $\mu$ mol/L) and Bf100 (benfotiamine 100 $\mu$ mol/L). Each group was performed in triplicates and stand for 24 or 72 hours exposed to benfotiamine (except the control). Subsequently, the quantification of thiamine was performed. **Results:** There were increase in thiamine in the groups that were supplemented with benfotiamine compared to control in both periods. When analyzed within the same group, only Bf100 showed a decrease in concentration in 72h. No differences were observed in the phosphate forms (TMP or TDP) for both concentrations and times tested. **Conclusion:** In view of our findings, we conclude that the in vitro use of benfotiamine increases the intracellular concentration of thiamine in 4T1 cells, although the same increase in its diphosphate form does not occur.

**Introduction:**

Benfotiamine (S-benzoylthiamine O-monophosphate), is a synthetic substance the pro-vitamin B1 by having a portion which negatively charged and therefore have polarity, not passively diffuses through the membranes. However, after ingestion, the molecule is dephosphorylated in the intestine by nonspecific phosphatases that remove the polar portion making it liposoluble, later acquiring the ability to passively diffuse through membranes and fall into the bloodstream until reaching the liver, where it will be transformed into thiamine by action of thioesterases on hepatocytes[1], [2]

The thiamine then formed, regains circulation again and will be mostly taken up by erythrocytes. Inside the erythrocytes, it will be diphosphated by the action of thiamine diphosphokinase, thus forming thiamine diphosphate (TDP), which is the biologically active form and acts as an enzymatic cofactor in the Krebs cycle[1], [2].

This same behavior within erythrocytes occurs in any other normal cells in the body. If there is no need, TDP can be turned into thiamine monophosphate (TMP) which can enter the bloodstream again[1], [2].

Tumor cells have a metabolism to obtain energy that escapes the Krebs cycle by decreasing the activity of pyruvate dehydrogenase (PDH) which is a TDP-dependent enzyme. With this escape, tumor cells generate a greater amount of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD<sup>+</sup>) by anaerobic pathway, which will be directed to oxidative phosphorylation to produce ATP[3].

Acting in an attempt to reverse this metabolism could hypothetically alter the cancer microenvironment, making it a possible beneficial adjuvant treatment.

Thus, we aim in this work to evaluate the metabolism of benfotiamine in a 4T1 cell culture of murine breast cancer that mimics triple negative cancer in humans.

**Materials and methods:*****Cell culture:***

The 4T1 cells, from the Oncology Research Institute, were kept in 15mL bottles with complete RPMI medium at pH 7.4 with 5% CO<sub>2</sub> at 37°C, then the cells were counted and reallocated in three groups, in triplicate, according to the concentration of benfotiamine used. in the culture medium, *ie*, control, containing the diluent (RPMI



medium) of benfotiamine, Bf50 (benfotiamine 50 $\mu$ mol/L) and Bf100 (benfotiamine 100 $\mu$ mol/L). Afterwards, the groups were divided and kept in an oven for 24 or 72 hours.

After treatment and exposure to benfotiamine, cells were washed, collected and counted, being frozen and stored in liquid nitrogen for further analysis.

### **Thiamine quantification**

Thiamine concentration was analyzed in the samples with the addition of 200  $\mu$ L of distilled water and subsequent rapid freezing in liquid nitrogen and thawed three consecutive times for lysis. Then, the lysate was deproteinized by adding 0.8M perchloric acid (1:1, vol/vol) and centrifuged at 5000 rpm for 10 min at 4°C. From this supernatant, 80ul was used and added to 50 uL of hexacyanoferrate potassium 30 mM and 50 ul of 0.8 M sodium hydroxide to derivatization. The solution was mixed with 20  $\mu$ L of methanol, and 20  $\mu$ L was injected into the chromatograph (Shimadzu LC-10AT – Shimadzu Instruments, Kyoto, Japan). Analyzes were performed on a C18 chromatographic column (Agilent, Sigma-Aldrich) using a mobile phase composed of 25 mM phosphate buffer (pH 7.0), methanol and acetonitrile (7:2:1, v /v/v) isocratically with flow of 1.0 mL/min. The fluorometric detector (Shimadzu RF-20A – Shimadzu Instruments) was set at 365 nm for excitation and 435 nm for emission. The concentration of thiamine and its esters (TMP and TDP) was normalized by the total protein concentration in the sample.[1].

### **Statistical analysis**

All data were tabulated in spreadsheets and analyzed using the statistical tools of graphpad prism version 8.0. To verify data distribution, the Shapiro- Wilk test was applied . After finding the normal distribution of data, we used two-factor analysis of variance (two-way ANOVA) and applied to the test Bonferroni . Results with values of 95% ( $p < 0.05$ ) were considered significant.

## Resultados:

The concentrations of thiamine and its phosphate esters are shown in Figure 1. It can be seen that there was an increase in thiamine (Figure 1A) in the groups that were supplemented with benfotiamine compared to controls in both periods. When analyzed within the same group, only Bf100 showed a decrease in concentration in 72h. No differences were observed in the phosphate forms (TMP or TDP) for both concentrations and times tested.

When we use the ratio between thiamine and TDP (Figure 2A), it is noted that there was only a difference in the Bf100 group, with a decrease from 24h to 72h. When the ratio between TDP and TMP (Figure 2B) was analyzed, only group C was higher at 72h.

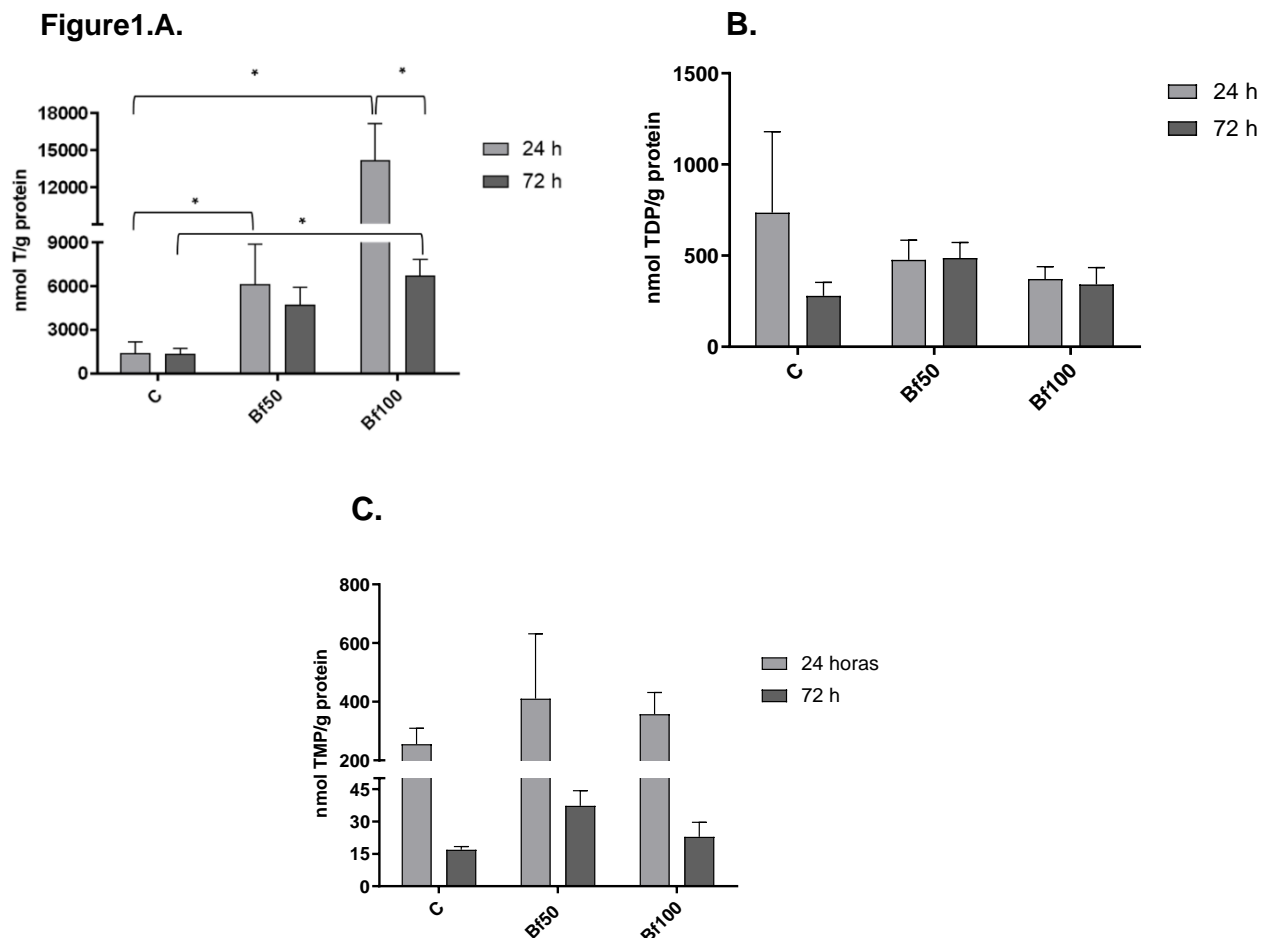


Figure 1 A. Comparisons of thiamine quantification. Figure 1 B: Comparisons of thiamine diphosphate quantification. Figure 1 C: Comparisons of thiamine monophosphate quantification. C = group control; Bf50 = benfotiamine 50 $\mu$ mol / L; Bf100 benfotiamine 100 $\mu$ mol / L. \*  $p < 0.05$ .

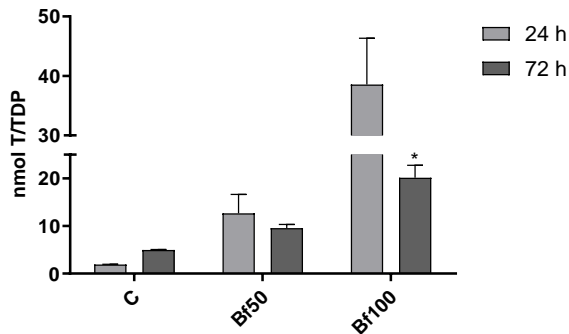
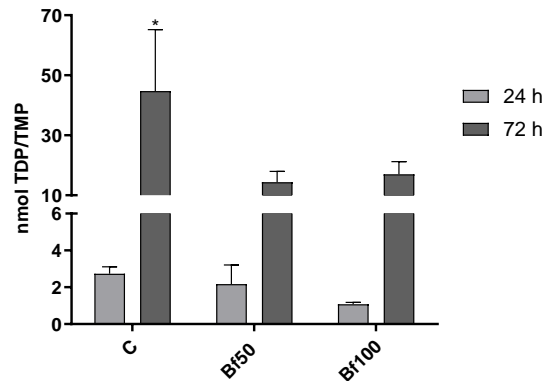
**Figure 2 A.****B.**

Figure 2 A. Comparisons of the ratio between thiamine and TDP. Figure 2 B: Comparisons of ratio between TDP and TMP. C = group control; Bf50 = benfotiamine 50 $\mu$ mol / L; Bf100 benfotiamine 100 $\mu$ mol / L. \*  $p < 0.05$

## Discussion:

The present study aimed to evaluate the metabolism of benfotiamine in a triple negative breast cancer cell culture. It was demonstrated, by the high concentration of intracellular thiamine, that 4T1 cells can perform the first steps of modifying the benfotiamine molecule, making it liposoluble and facilitating its entry into cells.

As TDP concentrations were not increased in the groups treated with benfotiamine, there seems to be a mechanism that limits the next step, which would be to transform thiamine into TDP, ie, its active operating form in the Krebs cycle. Theoretically, the non-increase of TDP could also be due to degradation from TDP to TMP. However, the ratio between TDP/TMP did not change, demonstrating that there was no transformation from TDP to TMP.

This study is unprecedented in evaluating the use of benfotiamine in 4T1 cells, opening possibilities for future work in vivo, investigating the mechanisms involved in the administration of benfotiamine and its subsequent action in the microenvironment of tumor cells. Furthermore, in vivo studies with benfotiamine supplementation may elucidate whether a longer duration can lead to an alteration of the transformation mechanism from thiamine to TDP.

## Conclusion:

In view of our findings, we conclude that the in vitro use of benfotiamine increases the intracellular concentration of thiamine in 4T1 cells, although the same increase in its diphosphate form does not occur.

**References:**

- [1] G. V. Portari, "Liver, plasma and erythrocyte levels of thiamine and its phosphate esters in rats with acute ethanol intoxication: A comparison of thiamine and benfotiamine administration", *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, p. 4, 2013.
- [2] M. Sambon, P. Wins, e L. Bettendorff, "Neuroprotective Effects of Thiamine and Precursors with Higher Bioavailability: Focus on Benfotiamine and Dibenzoylthiamine", *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, n° 11, p. 5418, 2021.
- [3] B. S. Hanberry, R. Berger, e J. A. Zastre, "High-dose vitamin B1 reduces proliferation in cancer cell lines analogous to dichloroacetate", *Cancer chemotherapy and pharmacology*, vol. 73, n° 3, p. 585–594, 2014.

**Acknowledgments**

This research was supported by Fundação de Amparo à pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) [grant number: APQ-00039-15] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [grant number: 423171/2016-0].

## 8. REFERÊNCIAS DA TESE

- ALVES, L. A.; BIESEK, S.; GUERRA, I. Estratégias de nutrição e suplementação no esporte. **São Paulo**, 2005.
- BALDASSARRE, G.; BELLETTI, B. Molecular biology of breast tumors and prognosis. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- BAST JR, R. C.; HOLLAND, J. F.; III, E. F. **Holland-Frei cancer medicine 8**. [s.l.] PMPH-USA, 2010. v. 8
- BELTRAMO, E. et al. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. **Diabetes/metabolism research and reviews**, v. 20, n. 4, p. 330–336, 2004a.
- BELTRAMO, E. et al. Thiamine and benfotiamine prevent increased apoptosis in endothelial cells and pericytes cultured in high glucose. **Diabetes/Metabolism Research and Reviews**, v. 20, n. 4, p. 330–336, jul. 2004b.
- BELTRAMO, E. et al. Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. **Acta Diabetol**, p. 11, 2008a.
- BELTRAMO, E. et al. Effects of thiamine and benfotiamine on intracellular glucose metabolism and relevance in the prevention of diabetic complications. **Acta diabetologica**, v. 45, n. 3, p. 131, 2008b.
- BETTENDORFF, L. The compartmentation of phosphorylated thiamine derivatives in cultured neuroblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1222, n. 1, p. 7–14, maio 1994.
- BÖCKER, W. et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. **Laboratory Investigation**, v. 82, n. 6, p. 737–746, 2002.
- BOHM, I. Apoptosis: The Complex Scenario for a Silent Cell Death. **Molecular Imaging & Biology**, v. 5, n. 1, p. 2–14, jan. 2003.
- BOLAÑOS, J. P. et al. Regulation of glycolysis and pentose–phosphate pathway by nitric oxide: Impact on neuronal survival. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1777, n. 7–8, p. 789–793, 2008.
- BOLAÑOS, J. P. et al. Regulation of glycolysis and pentose–phosphate pathway by nitric oxide: Impact on neuronal survival. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 5, [s.d.].
- CALLAGY, G. et al. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 12, n. 1, p. 27–34, 2003.
- CANÁRIO, A. C. G. et al. Physical activity, fatigue and quality of life in breast cancer patients. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 62, n. 1, p. 38–44, 2016.
- CANCARINI, I. et al. Micronutrients Involved in One-Carbon Metabolism and Risk of Breast Cancer Subtypes. **PLOS ONE**, v. 10, n. 9, p. e0138318, 16 set. 2015.

- CHOI, S.-K.; BAEK, S.-H.; CHOI, S.-W. The effects of endurance training and thiamine supplementation on anti-fatigue during exercise. **Journal of exercise nutrition & biochemistry**, v. 17, n. 4, p. 189, 2013.
- COHEN, J. J. Programmed cell death in the immune system. **Advances in immunology**, v. 50, p. 55–85, 1991.
- COMÍN-ANDUIX, B. et al. The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. **European Journal of Biochemistry**, v. 268, n. 15, p. 4177–4182, 2001.
- COOPER, G. M.; HAUSMAN, R. E. **The cell**. [s.l.] Sinauer Associates Sunderland, 2000. v. 85
- DE VISSER, K. E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature reviews cancer**, v. 6, n. 1, p. 24–37, 2006.
- DESANTIS, C. E. et al. International variation in female breast cancer incidence and mortality rates. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 24, n. 10, p. 1495–1506, 2015.
- DEXTER, D. L. et al. Heterogeneity of tumor cells from a single mouse mammary tumor. **Cancer research**, v. 38, n. 10, p. 3174–3181, 1978.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018a.
- GALLUZZI, L. et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death & Differentiation**, v. 25, n. 3, p. 486–541, 2018b.
- GHONCHEH, M.; SOLTANI, S.; SALEHINIYA, H. Disparities in Incidence and Mortality of Breast Cancer. **Iranian journal of public health**, v. 45, n. 2, p. 270–271, 2016.
- GRIFFITHS, J. Causes and consequences of hypoxia and acidity in tumour microenvironments. **Bioessays**, v. 23, n. 3, p. 295–296, 2001.
- HAMMES, H.-P. et al. Benfotiamine blocks three major pathways of hyperglycemic damage and prevents experimental diabetic retinopathy. **Nature Medicine**, v. 9, n. 3, p. 294–299, mar. 2003.
- HANAHAAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **cell**, v. 100, n. 1, p. 57–70, 2000.
- HONG, W. K. **Holland-Frei Cancer Medicine 8**. [s.l.] PMPH-USA, 2010. v. 8
- HOTCHKISS, R. S. et al. Cell death. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 16, p. 1570–1583, 2009.
- (INCA), I.N.C.A. Câncer de Mama**. , [s.d.]. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer\\_mama](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama)>. Acesso em: 9 jan. 2018
- INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 41–55, 2016a.
- INSUA-RODRÍGUEZ, J.; OSKARSSON, T. The extracellular matrix in breast cancer. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 41–55, 2016b.
- JEMAL, A. et al. CA: a cancer journal for clinicians. **Cancer statistics**, v. 60, n. 5, p. 277–300, 2010.

JONUS, H. C. et al. Thiamine mimetics sulbutiamine and benfotiamine as a nutraceutical approach to anticancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 121, p. 109648, jan. 2020.

KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wideranging Implications in Tissue Kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, ago. 1972a.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–257, 1972b.

LI, Y. et al. Small-sized polymeric micelles incorporating docetaxel suppress distant metastases in the clinically-relevant 4T1 mouse breast cancer model. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 329, 10 maio 2014a.

LI, Y. et al. Small-sized polymeric micelles incorporating docetaxel suppress distant metastases in the clinically-relevant 4T1 mouse breast cancer model. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, dez. 2014b.

LINDEN, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 9, p. 1638–1650, 2004.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death—I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkmoth. **Journal of insect physiology**, v. 11, n. 2, p. 123–133, 1965.

LONSDALE, D. et al. The potential of lipid soluble thiamine in the treatment of cancer. **AIMS Biophysics**, v. 7, n. 1, p. 17–26, 2020.

LU, J.; TAN, M.; CAI, Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. **Cancer letters**, v. 356, n. 2, p. 156–164, 2015a.

LU, J.; TAN, M.; CAI, Q. The Warburg effect in tumor progression: mitochondrial oxidative metabolism as an anti-metastasis mechanism. **Cancer letters**, v. 356, n. 2, p. 156–164, 2015b.

LƯƠNG, K. V. Q.; NGUYỄN, L. T. H. The Role of Thiamine in Cancer: Possible Genetic and Cellular Signaling Mechanisms. **CANCER GENOMICS**, p. 17, 2013.

MACHEDA, M. L.; ROGERS, S.; BEST, J. D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. **Journal of cellular physiology**, v. 202, n. 3, p. 654–662, 2005a.

MACHEDA, M. L.; ROGERS, S.; BEST, J. D. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. **Journal of Cellular Physiology**, v. 202, n. 3, p. 654–662, mar. 2005b.

MENDES, T. F. S.; KLUSKENS, L. D.; RODRIGUES, L. R. Triple Negative Breast Cancer: Nanosolutions for a Big Challenge. **Advanced Science**, v. 2, n. 11, p. 1500053, nov. 2015.

MORENO-SÁNCHEZ, R. et al. Energy metabolism in tumor cells. **The FEBS journal**, v. 274, n. 6, p. 1393–1418, 2007.

OLIVER, L.; VALLETTE, F. M. The role of caspases in cell death and differentiation. **Drug Resistance Updates**, v. 8, n. 3, p. 163–170, jun. 2005.

PÁCAL, L.; KURICOVÁ, K.; KAŇKOVÁ, K. Evidence for altered thiamine metabolism in diabetes: Is there a potential to oppose gluco- and lipotoxicity by rational supplementation? **World journal of diabetes**, v. 5, n. 3, p. 288, 2014.

PADOVANI, R. M. et al. Dietary reference intakes: aplicabilidade das tabelas em estudos nutricionais. **Revista de Nutrição**, 2006.

PATEL, M. S.; KOROTCHKINA, L. G. The biochemistry of the pyruvate dehydrogenase complex. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 31, n. 1, p. 5–15, 2003.

PEIN, M.; OSKARSSON, T. Microenvironment in metastasis: roadblocks and supportive niches. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 309, n. 10, p. C627–C638, 2015.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747–752, 2000.

POMERO, F. et al. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. **Acta diabetologica**, v. 38, n. 3, p. 135–138, 2001a.

POMERO, F. et al. Benfotiamine is similar to thiamine in correcting endothelial cell defects induced by high glucose. **Acta Diabetologica**, v. 38, n. 3, p. 135–138, 1 set. 2001b.

PORTARI, G. V. Liver, plasma and erythrocyte levels of thiamine and its phosphate esters in rats with acute ethanol intoxication: A comparison of thiamine and benfotiamine administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 4, 2013.

PORTARI, G. V.; VANNUCCHI, H.; JORDAO JR, A. A. Liver, plasma and erythrocyte levels of thiamine and its phosphate esters in rats with acute ethanol intoxication: A comparison of thiamine and benfotiamine administration. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 48, n. 4–5, p. 799–802, 2013.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 breast tumor model. **Current protocols in immunology**, v. 39, n. 1, p. 20–2, 2000.

PULASKI, B. A.; OSTRAND-ROSENBERG, S. Mouse 4T1 Breast Tumor Model. In: COLIGAN, J. E. et al. (Eds.). **Current Protocols in Immunology**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2001.

RARDIN, M. J. et al. Monitoring phosphorylation of the pyruvate dehydrogenase complex. **Analytical biochemistry**, v. 389, n. 2, p. 157–164, 2009.

SÁNCHEZ-RAMÍREZ, G. M. et al. Benfotiamine relieves inflammatory and neuropathic pain in rats. **European Journal of Pharmacology**, p. 6, 2006.

SAYERS, K. T. et al. Increased Secretory Leukocyte Protease Inhibitor (SLPI) Production by Highly Metastatic Mouse Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e104223, 11 ago. 2014.

SENUKHOVA, M. A. et al. Different types of tumor vessels in breast cancer: morphology and clinical value. **SpringerPlus**, v. 4, n. 1, p. 512, 2015.

SHOEB, M.; RAMANA, K. V. Anti-Inflammatory Effects of Benfotiamine are Mediated Through the Regulation of Arachidonic Acid Pathway in Macrophages. **Free radical biology & medicine**, v. 52, n. 1, p. 182–190, 1 jan. 2012.

SMITH, R. A. et al. American Cancer Society guidelines for breast cancer screening: update 2003. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 53, n. 3, p. 141–169, 2003.



SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 19, p. 10869–10874, 2001.

SØRLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European journal of cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667–2675, 2004.

The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. p. 6, 2001.

TORRE, L. A. et al. Global cancer statistics, 2012. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 65, n. 2, p. 87–108, 2015.

TOWER, J. Programmed cell death in aging. **Ageing research reviews**, v. 23, p. 90–100, 2015.

VANDER HEIDEN, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. **Nature reviews Drug discovery**, v. 10, n. 9, p. 671–684, 2011a.

VANDER HEIDEN, M. G. Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, p. 671, 31 ago. 2011b.

VERMES, I. et al. A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **Journal of Immunological Methods**, v. 184, n. 1, p. 39–51, jul. 1995.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956a.

WARBURG, O. On the origin of cancer cells. **Science**, v. 123, n. 3191, p. 309–314, 1956b.

**WHO | Breast cancer**. Disponível em: <<https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>>. Acesso em: 12 mar. 2020.

YEO, S. K.; GUAN, J.-L. Breast cancer: multiple subtypes within a tumor? **Trends in cancer**, v. 3, n. 11, p. 753–760, 2017.

YOSHIMURA, T. et al. Monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 produced by stromal cells promotes lung metastasis of 4T1 murine breast cancer cells. **PLoS one**, v. 8, n. 3, p. e58791, 2013a.

YOSHIMURA, T. et al. Monocyte Chemoattractant Protein-1/CCL2 Produced by Stromal Cells Promotes Lung Metastasis of 4T1 Murine Breast Cancer Cells. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. e58791, 18 mar. 2013b.