



**FACULDADE DE CIÊNCIAS DA NUTRIÇÃO E
ALIMENTAÇÃO DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Absorção intestinal de tiamina:
caracterização e modulação
nutricional**

Adelaide Clara Faria Álvares de Lemos

**Porto
Julho de 2003**



ÍNDICE

1. RESUMO	5
2. INTRODUÇÃO	6
3. OBJECTIVOS	11
4. MATERIAIS E MÉTODOS	12
5. RESULTADOS	16
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÃO	43
8. BIBLIOGRAFIA	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- ASF – *amphiphilic solute facilitator* (facilitador de solutos anfifílicos)
- BBMVs - vesículas de membranas com bordadura em escova
- CLA – ácido linoleico conjugado
- CP – chá preto
- CV – chá verde
- DB-AMPC – dibutiril-AMPC
- DHA – ácido docosa-hexaenóico
- DMSO – dimetilssulfóxido
- D22 – decínio 22
- EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid* (ácido etilenodiaminotetracético)
- EGCG – (-)-epigallocatequina-3-galato
- EMT – *extraneuronal monoamine transporter* (transportador extraneuronal de monoaminas)
- EtOH – etanol
- hEMT – *human extraneuronal monoamine transporter* (transportador extraneuronal de monoaminas humano)
- MPP⁺ – 1-metil-4-fenilpiridínio
- NMN – *N*-metilnicotinamida
- OCTs – *organic cation transporters* (transportadores de catiões orgânicos)
- OCT1 – *organic cation transporter 1* (transportador de catiões orgânicos 1)
- OCT2 – *organic cation transporter 2* (transportador de catiões orgânicos 2)
- pH – operador p (logaritmo do inverso) da actividade hidrioniónica
- PKA – *protein kinase A* (cínase A de proteínas)

PTPs – *protein tyrosine phosphatases* (fosfátases de proteínas em resíduos de tirosina)

TEA – tetraetilamónio

ThT1 – *thiamine transporter 1* (transportador da tiamina 1)

ThT2 – *thiamine transporter 2* (transportador da tiamina 2)

TRMA – *thiamine-responsive megaloblastic Anemia* (anemia megaloblástica sensível à tiamina)

TPP – *thiamine pyrophosphate* (pirofosfato de tiamina ou cocarboxilase)

VB – vinho branco

VBD – vinho branco desalcoholizado

VT – vinho tinto

VTD – vinho tinto desalcoholizado

RFCs – *reduced folate carriers* (transportadores de folato na forma reduzida)

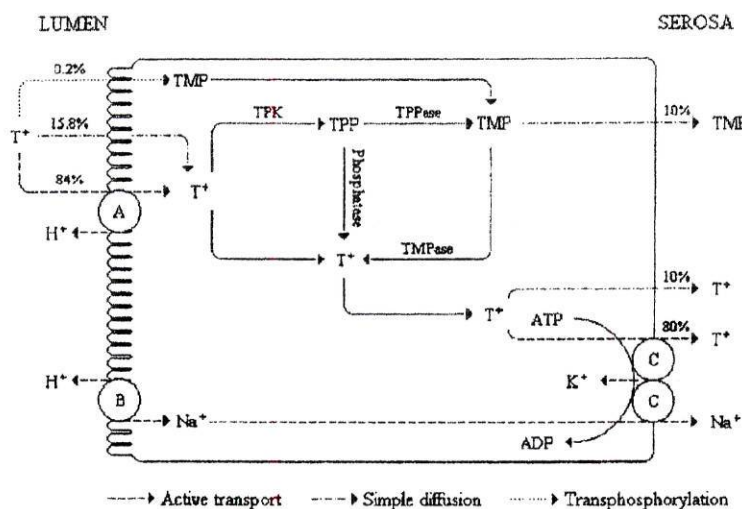
RFC1 – *reduced folate carrier 1* (transportador de folato na forma reduzida 1)

1. RESUMO

A tiamina (vitamina B₁) é uma vitamina hidrossolúvel que deve ser obtida a partir da dieta, essencial para o normal funcionamento celular. Este trabalho teve como objectivos a caracterização farmacológica e o estudo da modulação nutricional do transporte apical de tiamina, no epitélio intestinal. Para tal, foram usadas células Caco-2 (linha celular de adenocarcinoma de cólon humano, com fenótipo enterocítico) em cultura. Estas células foram pré-tratadas com diferentes concentrações dos compostos em estudo e incubadas com T⁺-³H (400 nM), a 37°C. Os nossos resultados mostram que a captação apical de tiamina, nas células Caco-2: (i) é um cotransporte T⁺/H⁺; (ii) é independente do sódio, do cloreto e do potencial; e (iii) é diferentemente afectada pelos vários catiões orgânicos, conhecidos substratos/inibidores dos transportadores de catiões orgânicos. Os nossos resultados sugerem que neste transporte está envolvido mais que um transportador – ThT1 ou ThT2 (transportadores específicos da tiamina) e um, ou mais, membros da ASF, provavelmente o EMT. As bebidas testadas (vinhos, cervejas e chás) alteram significativamente o transporte intestinal de tiamina, excepto o vinho branco com álcool. O etanol reduz significativamente a captação de tiamina. No entanto, os vinhos e a cerveja desalcoholizados inibem este transporte. Por outro lado, os chás, verde e preto, aqui testados, aumentam significativamente o transporte de T⁺-³H. O ácido fólico inibe significativamente o transporte de T⁺-³H, efeito dependente da concentração. Estes resultados deverão ser tidos em conta na programação da dieta, de modo a assegurar-se uma ingestão adequada de vitamina B₁.

2. INTRODUÇÃO

A tiamina (vitamina B₁) é uma vitamina hidrossolúvel, essencial para o normal funcionamento celular [1, 2]. Quimicamente, a tiamina é um catião orgânico que, dependendo do pH da solução, pode existir como catião monovalente ou bivalente. É um composto de amônio quaternário, mais concretamente uma amina quaternária caracterizada por um núcleo de pirimidina ligado a um anel tiazol, com um elevado peso molecular (337 Da como hidrocloreto) [3-6]. O Homem e outros mamíferos não têm capacidade de sintetizar a tiamina, pelo que esta tem que ser obtida a partir de fontes exógenas (dieta), através da absorção intestinal. O intestino tem, assim, um papel crucial na manutenção dos valores normais de tiamina no nosso organismo [1, 7, 8].



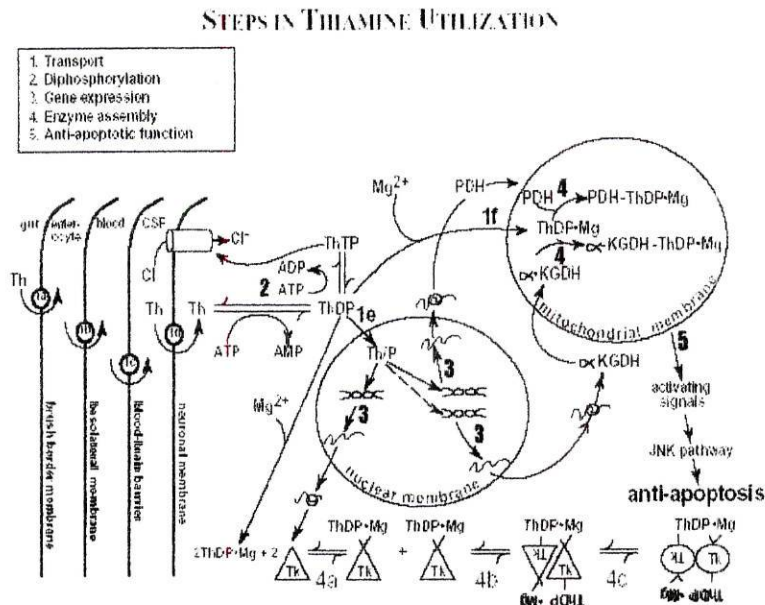
Esquema 1 – Representação esquemática da absorção intestinal de tiamina. Retirado de [6].

Uma vez que só os compostos apolares atravessam livremente as membranas celulares, a tiamina, sendo um catião orgânico (T^+), necessita de transportadores membranares para ser captada pelas células. Curiosamente, só no final da década de 90 foram identificados e caracterizados os transportadores

membranares, ThT1 e ThT2, responsáveis pelo transporte desta vitamina nas diferentes células [4, 9].

Nos alimentos, a tiamina existe sobretudo na forma fosforilada, predominantemente como pirofosfato de tiamina (*thiamine pyrophosphate*, TPP). Contudo, após uma refeição normal, predomina no lúmen intestinal a tiamina na forma livre, a qual resultou da hidrólise do TPP. É na forma livre que a vitamina B₁ é absorvida (Esquema 1), voltando a ser fosforilada no interior das células por acção da difosfocínase da tiamina [6, 7, 10, 11]. Para além das duas formas mencionadas, a tiamina pode ainda existir nos tecidos animais e nos alimentos na forma de monofosfato de tiamina (*thiamine monophosphate*, TMP) e trifosfato de tiamina (*thiamine triphosphate*, TTP). O conteúdo total de tiamina (soma das quatro formas) nos tecidos animais é, usualmente, da ordem de alguns µg/g, sendo o TPP a forma mais abundante (aproximadamente 87% do total de tiamina) e, funcionalmente, o composto mais bem caracterizado [6]. Este composto, também denominado cocarboxílase, é a forma activa da vitamina, servindo como cofactor de várias enzimas envolvidas no catabolismo dos glicídeos (Esquema 2) [12]. Estas enzimas incluem a desidrogénase do piruvato, a desidrogénase do α-cetoglutarato, a desidrogénase dos cetoácidos de cadeia ramificada e a transcetolase [6, 11]. As três desidrogénases catalisam a redução do NAD⁺ e a libertação de uma molécula de CO₂, ou seja, promovem a descarboxilação oxidativa dos respectivos α-cetoácidos; a transcetolase, por seu lado, catalisa a transferência de unidades de 2 carbonos na via das pentoses fosforiladas [11]. Esta via está envolvida na síntese de ribose, a qual é indispensável à formação dos ácidos nucleicos e à replicação celular (Esquema 2). Assim, é compreensível que as células tumorais, devido ao seu rápido crescimento e multiplicação,

apresentem uma elevada actividade da transcetolase. Em tumores em avançado estado de desenvolvimento, onde é comum a deficiência de tiamina, a suplementação com esta vitamina pode aumentar significativamente o crescimento tumoral devido à activação da transcetolase. Por outro lado, o uso de antagonistas do transporte transmembranar de tiamina parece diminuir significativamente a proliferação celular, sendo este efeito devido à inibição da transcetolase (por falta do cofactor) e consequente incapacidade de produzir ribose suficiente para a síntese dos ácidos nucleicos [12, 13].



Esquema 2 – Diagrama representativo das diferentes vias de utilização da tiamina nas diferentes células. Numa deficiência de tiamina, a alteração em qualquer uma destas vias, poderá explicar diferenças inter-individuais na sensibilidade à carência desta vitamina. A captação celular da tiamina tem 2 componentes, (1) o transporte e (2) a difosforilação da tiamina (pela difosforilase da tiamina). O transporte ocorre a vários níveis: 1a e 1b, do lúmen intestinal para a corrente sanguínea; 1c, através da barreira hemo-encefálica; 1d, para o interior das células; 1e, para o núcleo; 1f, para a mitocôndria. (3) A tiamina pode alterar a expressão genética das enzimas que utilizam o TPP como cofactor. (4a, 4b e 4c) A transcetolase (TK) requer Mg^{2+} como cofactor. (5) Durante a deficiência em tiamina ocorrem desequilíbrios metabólicos que desencadeiam a apoptose. Adaptado de [12].

A deficiência de tiamina no Homem conduz a uma grande variedade de manifestações clínicas que envolvem, essencialmente, os sistemas cardiovascular (*wet beriberi*) e nervoso (*dry beriberi*). No primeiro caso, é comum

a ocorrência de vasodilatação periférica, insuficiência ventricular e edema por retenção de sódio e água. Relativamente ao sistema nervoso, as principais manifestações incluem neuropatia periférica, encefalopatia de Wernicke e psicose amnésica do síndrome de Korsakoff [14, 15]. A deficiência de tiamina ocorre numa elevada percentagem de alcoólicos [1, 2, 7, 11, 12, 14-16]. Uma diminuição da ingestão e da absorção da vitamina, e uma redução na capacidade de utilizar aquela que é absorvida, parecem ser os principais factores responsáveis pela carência desta vitamina nestes indivíduos [11, 12, 15]. A maioria dos indivíduos com o síndrome de Wernicke-Korsakoff têm uma história de abuso de consumo de álcool. A encefalopatia de Wernicke é caracterizada por distúrbios na motilidade ocular e por ataxia; a psicose de Korsakoff caracteriza-se por confusão mental e amnésia [11, 14, 15].

A deficiência de tiamina ocorre ainda em pacientes com diabetes mellitus [1, 2, 7, 17], em doentes celíacos [18], em doentes renais [2, 7, 19], em pacientes submetidos a tratamento crónico com diuréticos [1, 20, 21] e em idosos [1, 7, 22]. A anemia megaloblástica sensível à tiamina (*thiamine-responsive megaloblastic anemia*, TRMA) é uma doença autossómica recessiva caracterizada por manifestações que incluem anemia megaloblástica, diabetes mellitus e surdez, a qual está também associada à deficiência de tiamina [2, 8, 23, 24]. Foi demonstrado que mutações no gene *SLC19A2*, que codifica um transportador da tiamina, o ThT1, estão na base desta patologia [25-27].

Recentemente, foi identificada e caracterizada uma nova família de transportadores transmembranares, a família de transportadores do folato na forma reduzida (RFCs; *reduced folate carriers*). O primeiro transportador desta família, o RFC1 (*SLC19A1*), foi clonado em 1994 [28]. Este transportador,

presente nas membranas apical e/ou basolateral, de acordo com as células em causa [29], é responsável pelo transporte do anião folato. O SLC19A2 (ThT1), com uma distribuição ubiquitária, mas presente sobretudo na placenta, músculo liso, coração, e, em menor quantidade, no intestino, no cérebro e rim, e responsável pelo transporte do catião tiamina, foi clonado em 1999 [4]. Mais recentemente, em 2000, foi clonado o SLC19A3, um segundo transportador da tiamina (ThT2), o qual apresenta elevada homologia com os dois transportadores anteriores [9, 30]. O transporte da tiamina mediado pelo ThT1 é independente do sódio e modulado por um gradiente H^+/OH^- . Para além disso, este transportador revela grande especificidade para a tiamina. Estudos recentes revelam que é expresso em diferentes tecidos do tracto gastrointestinal do Homem, levantando a possibilidade deste transportador desempenhar um papel na absorção intestinal de tiamina [31]. O ThT2 tem uma sensibilidade ao pH semelhante ao ThT1 e revela também grande especificidade para a tiamina. Tem uma expressão mais abundante na placenta, seguida pelo fígado, rim e coração [9, 30].

O vinho, a cerveja e o chá são bebidas frequentemente consumidas no nosso dia-a-dia. Nos últimos anos têm surgido vários estudos epidemiológicos e bioquímicos que sugerem um efeito protector destas bebidas, especialmente do vinho tinto e do chá verde, relativamente a várias doenças como o cancro e doenças cardiovasculares [32-36]. Estas bebidas têm em comum o facto de serem ricas em compostos fenólicos. Estes compostos têm sido alvo de variadíssimos estudos, os quais lhes têm atribuído uma grande multiplicidade de propriedades bastante benéficas para a saúde. De entre elas, destacam-se a actividade anti-inflamatória, anti-oxidante, anti-alérgica, anti-vírica, anti-trombótica e anti-carcinogénica [37-39].

Embora o transporte intestinal da tiamina tenha sido já alvo de alguns estudos, pouco ou nada se sabe sobre a sua modulação nutricional. Pelo consumo crescente destas bebidas e pela parca informação sobre a sua influência na absorção intestinal de tiamina, pareceu-nos pertinente procurar estudar a influência destas bebidas e de alguns dos compostos fenólicos que delas fazem parte no referido transporte. No sentido de ir um pouco mais longe no estudo desta modulação nutricional, investigámos também os efeitos de alguns nutrientes que fazem parte da nossa alimentação diária, como alguns ácidos aminados, ácidos gordos e vitaminas.

Para realizar estes estudos usámos como modelo celular culturas de células Caco-2. Estas células são derivadas de adenocarcinoma de cólon humano mas, no seu estado de diferenciação completa, apresentam fenótipo enterocítico. Após cerca de 5 dias de cultura elas formam monocamadas e apresentam microvilosidades, enzimas, receptores e transportadores característicos do epitélio intestinal, constituindo um bom modelo para estudos de transporte intestinal, como aquele que pretendíamos realizar [40].

3. OBJECTIVOS

Este trabalho de investigação teve como principais objectivos fazer a caracterização farmacológica e determinação da modulação nutricional do transporte intestinal da tiamina. Pretendemos, assim, com este trabalho, avaliar possíveis interacções fármaco/nutriente, alimento/nutriente e nutriente/nutriente.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais. Tiamina-³H (atividade específica 10 Ci mmol⁻¹; American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO, EUA); DMSO (dimetilssulfóxido), Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Alemanha); ácido *all trans*-retinóico; ácido ascórbico; ácido docosa-hexaenóico (DHA); ácido fólico; ácido linoleico conjugado (CLA); ácido oleico; brometo de tetraetilamónio (TEA); cafeína; (+)-catequina hidratada; cimetidina; cloreto de colina; cloreto de *N*-metilnicotinamida (NMN); corticosterona; crisina; decínio 22 (D22, iodeto de 1,1'-dietil-2,2'-cianina); dibutiril-AMPc sódico (DB-AMPc); di-hidrocloreto de histamina; epicatequina; EGCG ((-)-epigallocatequina-3-galato); β-estradiol; L-fenilalanina; fosfato de piridoxal (vitamina B₆); HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanessulfónico); hidrocloreto de amilorido; hidrocloreto de amprólio; hidrocloreto de L-arginina; hidrocloreto de clonidina; hidrocloreto de dopamina; hidrocloreto de guanidina; hidrocloreto de D-histidina; hidrocloreto de L-histidina; hidrocloreto de levamisol; hidrocloreto de oxitiamina; hidrocloreto de pirofosfato de tiamina (TPP; co-carboxilase); hidrocloreto de tiamina; MEM (*Minimal Essential Medium*); miricetina; MPP⁺ (iodeto de 1-metil-4-fenilpiridínio); ortovanadato de sódio; progesterona; quercetina di-hidratada; resveratrol; riboflavina; rutina; L-serina; solução de penicilina/estreptomicina; solução de tripsina-EDTA; soro de feto de Boi; succinato de α-tocoferol; teofilina; tris-HCl (hidrocloreto de tris-(hidroximetil)-aminometano); xanto-humol; (Sigma, St. Louis, MO, EUA); cloreto de cianina 863 (1-etil-2-([1,4-dimetil-2-fenil-pirimidinilideno]metil)quinolínio; ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, Cal., EUA).

Vinho tinto e vinho branco da região do Douro; cerveja com álcool branca e preta; cerveja sem álcool branca; chá verde e chá preto.

Culturas celulares. A linha celular Caco-2 foi obtida da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, EUA) e utilizada entre as passagens 14 e 74. As células Caco-2 (ATCC HTB-37) foram mantidas a 37°C em atmosfera humidificada com 5% de CO₂ / 95% de ar e foram cultivadas em *Minimal Essential Medium* (MEM; Sigma, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 15% de soro de feto de Boi, 25 mM de HEPES, 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina B (todos da Sigma, St. Louis, MO, EUA).

O meio de cultura foi mudado a cada 2-3 dias e a divisão da cultura foi efectuada a cada 7 dias. Para realizar uma sub-cultura, as células foram removidas enzimaticamente das placas (0,25% de Tripsina-EDTA, 5 minutos, 37°C), diluídas a 1:3 e semeadas em placas de Petri de poliestireno (Ø 60 mm; Corning Costar, NY, EUA).

Para as experiências, as células foram semeadas e cultivadas em placas de poliestireno com 24 poços (Ø 16 mm; Corning Costar).

Durante as 24 horas anteriores à experiência as células foram mantidas em meio de cultura sem soro de feto de Boi. As experiências foram realizadas em células após 9-20 dias de cultura.

Estudos de transporte da tiamina-³H em células Caco-2. O estudo do transporte (captação) da tiamina triciada foi realizado, de acordo com a

metodologia abaixo referida, em células Caco-2, em monocamada, estando exposto apenas o bordo apical (bordadura em escova).

Inicialmente, o meio de cultura foi aspirado e as células foram lavadas com meio Hanks (ver composição abaixo) a 37°C. De seguida, as células foram pré-incubadas durante 20 minutos com meio Hanks a 37°C, na presença ou ausência dos diferentes compostos. O transporte foi iniciado pela adição de 250 µL de meio Hanks contendo tiamina-³H (400 nM). A incubação foi terminada após 3 minutos pela adição de 500 µL de meio Hanks a 4°C. As células foram então solubilizadas pela adição de 300 µL de Triton X-100 a 0,1% (v/v) (em Tris-HCl a 5 mM, pH 7,4) e permaneceram durante 12 horas à temperatura ambiente. O meio Hanks tinha a seguinte composição (em mM): 137 de NaCl, 5 de KCl, 0,8 de MgSO₄, 1,0 de MgCl₂, 0,33 de Na₂HPO₄, 0,44 de KH₂PO₄, 0,25 de CaCl₂, 0,15 de Tris-HCl e 1,0 de butirato de sódio, com pH ajustado para 7,4.

A radioactividade no interior das células foi determinada por cintilometria líquida.

Estudo do efeito de compostos. Os compostos cujo efeito se pretendia testar estiveram presentes durante a pré-incubação e a incubação, excepto quando referido.

Extracção do etanol dos vinhos. Os vinhos tintos e brancos foram submetidos a evaporação do etanol num evaporador rotativo (BUCCHI, waterbath B480), à pressão de 75 mbar a 30°C durante aproximadamente 60 minutos. A concentração final foi determinada por cromatografia gasosa [41]. A extracção do etanol foi realizada pela Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto.

Preparação dos chás em estudo. Infusão numa saqueta (1,5 g de chá preto e 1,75 g de chá verde) em 250 mL de água a ferver, durante 2 minutos para o chá preto e 5 minutos para o chá verde.

Estudo da dependência do Na⁺ e do Cl⁻. Para testar a influência do Na⁺ e Cl⁻ extracelulares, o NaCl do meio Hanks foi substituído por LiCl, cloreto de colina, NaF ou KCl, de forma a manter a isosmolaridade, durante os 20 minutos de pré-incubação e os 3 minutos de incubação.

Quantificação das proteínas. A quantidade de proteína das células foi determinada pelo método de Bradford [42], tendo como referência a albumina do soro humano.

Análise estatística. Os resultados são apresentados na forma de médias aritméticas \pm SEM (erro padrão da média). A diferença entre vários grupos foi avaliada usando o teste de análise de variância (teste ANOVA) seguido do teste Bonferroni. Para a comparação entre dois grupos foi usado o teste *t* de Student. As diferenças foram consideradas significativas quando foi obtido um $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

A – Caracterização da captação intestinal de tiamina

A captação celular de tiamina-³H foi linear até aos 5 minutos de incubação, pelo que nos estudos subsequentes as células foram incubadas durante 3 minutos (400 nM de tiamina-³H), na presença ou na ausência dos compostos em estudo (figura 1).

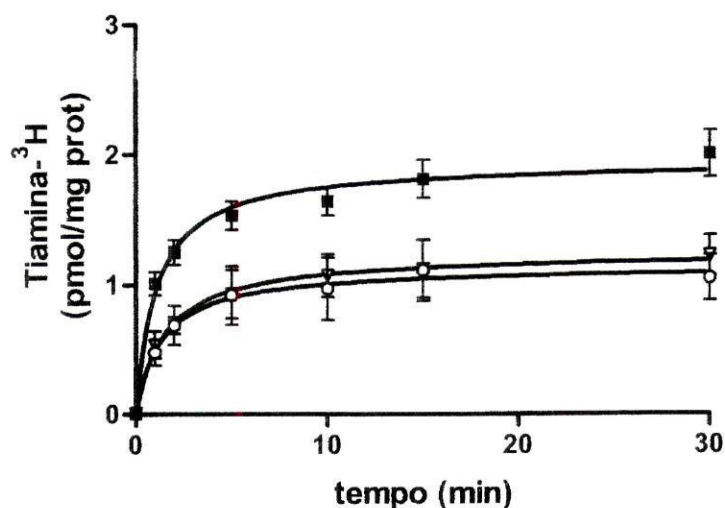


Figura 1 - Variação da captação celular de tiamina-³H em função do tempo de incubação, nas células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 100 nM na ausência (■; *n*=4) ou na presença de tiamina 100 µM (□; *n*=2) ou de amprólio 100 µM (∇; *n*=2). Os resultados são apresentados sob a forma de média aritmética±SEM.

Dependência do pH e efeito do amilorido. O transporte de tiamina-³H revelou-se dependente do pH, uma vez que a acidificação do meio extracelular facilitou a captação apical desta vitamina, nestas células (figura 2A). Estes resultados foram confirmados por outros estudos nos quais procedemos a uma acidificação do meio intracelular. Nestes estudos as células foram pré-incubadas durante 30 minutos em meio com NH₄Cl (em substituição de todo o NaCl) e incubadas durante 3 minutos com tiamina-³H 400 nM em meio em que

o NaCl foi substituído por KCl. Para controlo destes estudos, as células foram pré-incubadas durante 30 minutos e incubadas 3 minutos (na presença de tiamina-³H 400 nM), sempre em meios sem NaCl mas com KCl em substituição. Nestes estudos de acidificação do meio intracelular, foi observada uma inibição significativa da captação de tiamina-³H, por comparação com o respectivo controlo (figura 2B). A inibição do trocador Na⁺/H⁺ com amilorido (1 mM) resultou numa diminuição significativa da captação de tiamina-³H (para cerca de 47±7% (*n*=4), comparativamente ao controlo (7,31±0,40 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, *n*=25)).

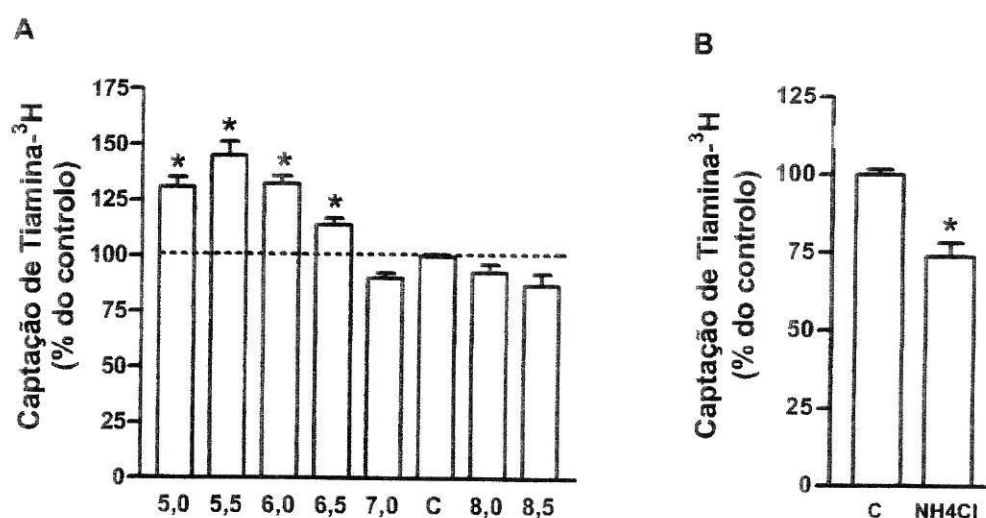


Figura 2 - A - Efeito da variação do pH extracelular de 5 a 8,5 (*n*=6-10) na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controlo (C; 5,65±0,51 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, *n*=17). **B -** Efeito da acidificação do meio intracelular (*n*=6) na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 30 minutos na presença ou ausência (controlo; KCl) de NH₄Cl (em substituição isosmolar do NaCl) e incubadas na presença de KCl, a 37°C, com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controlo (C; 6,51±0,63 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, *n*=6). **P*<0,05 vs respectivo controlo.

Dependência do sódio, do cloreto e do potencial. A substituição, nos meios de pré- e de incubação, do NaCl por LiCl ou KCl não conduziu a alterações significativas no transporte da tiamina-³H relativamente ao controlo (92±5%, *n*=17 e 108±10% do controlo, *n*=10; a captação controlo foi de 5,65±0,51 pmol de

tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=17$, respectivamente). Contudo, quando o NaCl foi substituído por cloreto de colina verificou-se uma redução significativa no referido transporte (para $44\pm 1\%$ do controlo, $n=10$). Quando foi usado o NaF, registou-se também uma tendência para diminuição na captação da vitamina (para $85\pm 2\%$, $n=12$), mas esta não foi significativa (figura 3).

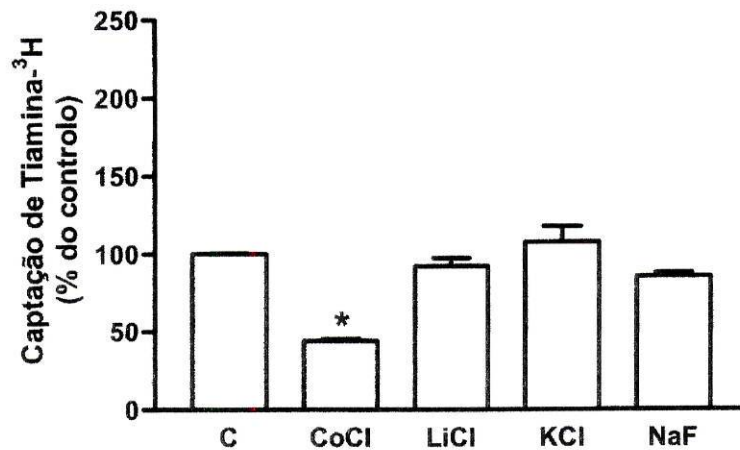


Figura 3 – Efeito da substituição do sódio ou cloro nos meios de pré- e de incubação sobre a captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos. O NaCl do meio extracelular foi isosmolarmente substituído por cloreto de colina (CoCl; $n=10$), LiCl ($n=17$), KCl ($n=10$) ou NaF ($n=12$). Os resultados são apresentados sob a forma de % do controlo (C; $5,65\pm 0,51$ pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=17$). * $P<0,05$ vs controlo.

Efeito de Análogos da Tiamina. A oxitiamina e o amprólio tiveram um efeito inibitório sobre a captação celular de tiamina-³H, efeito este dependente da concentração (figura 1 e 4). A presença de tiamina não radioactiva levou também, numa forma dependente da concentração, a uma redução significativa da captação de tiamina-³H (figura 1 e 4).

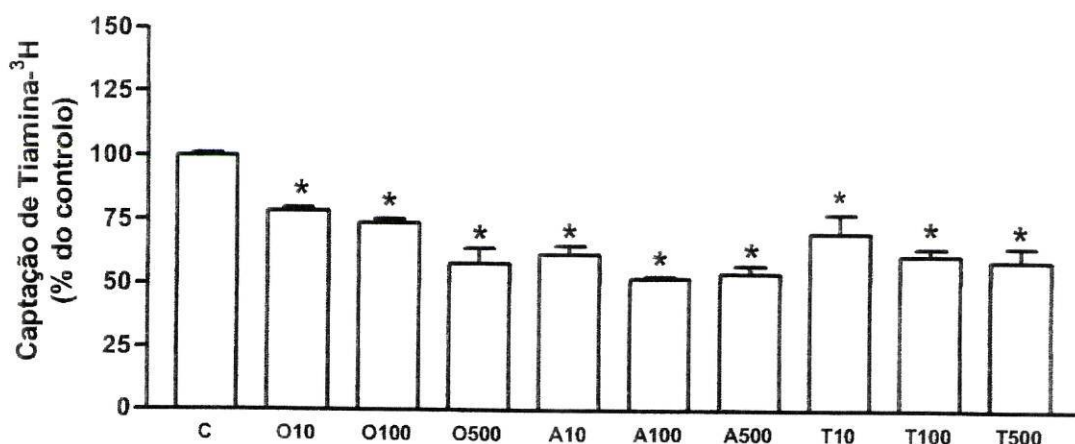


Figura 4 - Efeito da oxitiamina (10 μM , O10, $n=2$; 100 μM , O100, $n=2$ e 500 μM , O500, $n=2$), do amprólio (10 μM , A10, $n=4$; 100 μM , A100, $n=4$ e 500 μM , A500, $n=4$) e da tiamina (10 μM , T10, $n=2$; 100 μM , T100, $n=2$ e 500 μM , T500, $n=2$) na captação celular de tiamina- ^3H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com 400 nM de tiamina- ^3H durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle; C) destes compostos. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle (7,31 \pm 0,37 pmol de tiamina- ^3H /mg de proteína por 3 minutos, $n=32$). * $P<0,05$ vs controle.

Efeito de Moduladores dos OCTs. Dos diferentes moduladores dos OCTs (*organic cations transporters*; transportadores de catiões orgânicos) testados, apenas a clonidina (100 μM), o MPP $^+$ (100 μM) e o D22 (5 μM e 50 μM) foram capazes de inibir significativamente a captação de tiamina- ^3H , pelas células Caco-2 (figura 5). De facto, outros substratos/inibidores dos OCTs testados, como a histamina (500 μM), a cimetidina (100 μM), a guanidina (100 μM e 500 μM), o TEA (100 μM), a colina (100 μM e 1 mM), a NMN (100 μM), a corticosterona (270 μM) e a cianina 863 (1 μM) não modificaram significativamente a captação de tiamina- ^3H nestas células (resultados não apresentados). Curiosamente, a dopamina (100 μM) foi capaz de aumentar significativamente a captação celular de tiamina- ^3H (para 118 \pm 3%, $n=3$) quando comparada com o respectivo controle (7,31 \pm 0,37 pmol de tiamina- ^3H /mg de proteína por 3 minutos, $n=32$).

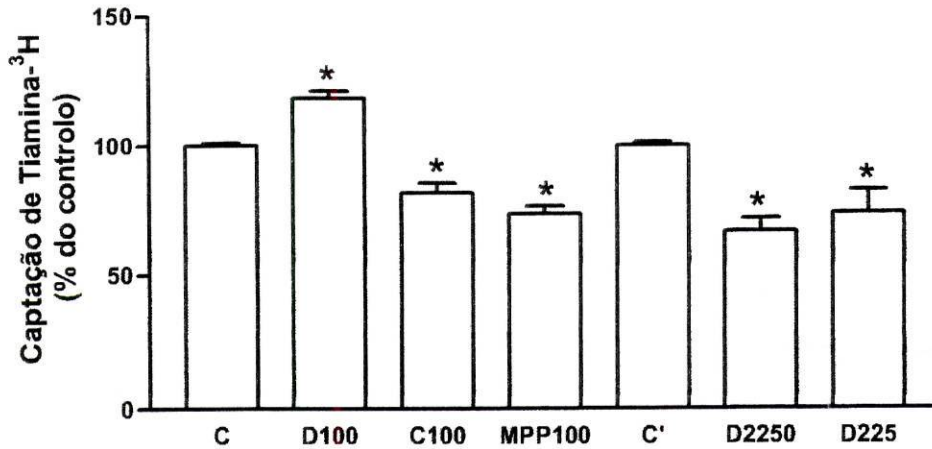


Figura 5 - Efeito da dopamina (100 μ M, D100, $n=3$), da clonidina (100 μ M, C100, $n=6$), do MPP⁺ (100 μ M, MPP100, $n=7$) e do D22 (50 μ M, D2250, $n=5$ e 5 μ M, D225, $n=4$) na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com 400 nM de tiamina-³H durante 3 minutos, na presença ou ausência (controlo; C e C') destes compostos. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controlo (C, $7,31 \pm 0,37$ pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=32$ e C', $6,13 \pm 0,37$ pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=22$). * $P < 0,05$ vs controlo.

Efeito de Inibidores de Fosfatases. Os dois inibidores de fosfatases testados, o levamisol (500 μ M) e o vanadato (100 μ M), provocaram uma diminuição significativa na captação celular de tiamina-³H, quando comparados com o respectivo controlo ($7,31 \pm 0,37$ pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=32$), tendo-se verificado um efeito mais acentuado com o levamisol ($56 \pm 5\%$ do controlo, $n=6$) do que com o vanadato ($88 \pm 3\%$ do controlo, $n=6$) (figura 6).

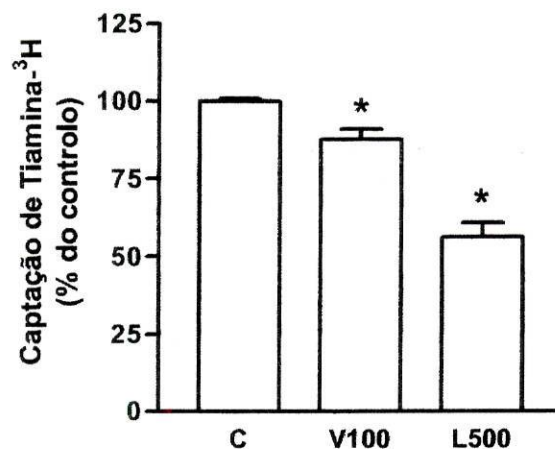


Figura 6 - Efeito do vanadato (100 μ M, V100, $n=6$) e do levamisol (500 μ M, L500, $n=6$) na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20

minutos e incubadas a 37°C com 400 nM de tiamina-³H durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle; C) destes compostos. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle ($7,31 \pm 0,37$ pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=32$). * $P < 0,05$ vs controle.

Efeito do DB-AMPC. O aumento dos níveis intracelulares de AMPc, induzido pelo tratamento das células durante 20 minutos com o análogo DB-AMPC (2,5 mM), reduziu significativamente (para $85 \pm 3\%$ do controle; $n=4$) a captação de tiamina-³H, o que sugere um possível envolvimento da via da cínase A de proteínas (PKA) na regulação do transporte apical de tiamina nas células Caco-2.

Efeito de Esteróides. O β -estradiol (100 μ M) diminuiu significativamente a captação de tiamina-³H, pelas células Caco-2, em relação ao respectivo controle. A progesterona (100 μ M e 200 μ M) também reduziu significativamente a captação de tiamina-³H (figura 7). Como se pode observar na figura, os resultados sugerem um efeito da progesterona dependente da concentração.

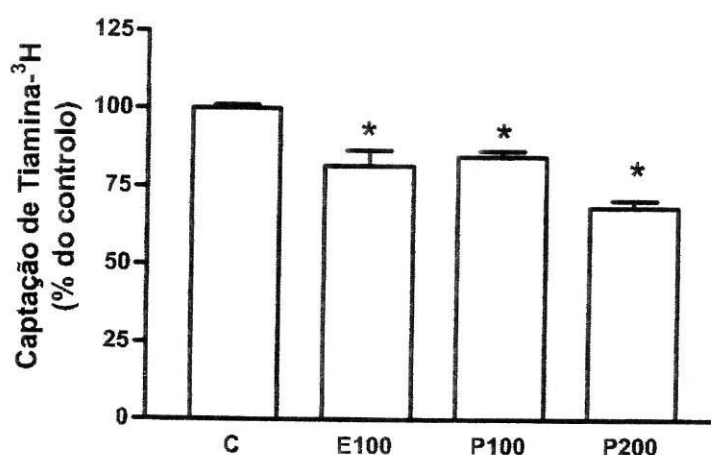


Figura 7 - Efeito do β -estradiol (100 μ M, E100, $n=4$) e da progesterona (100 μ M, P100, $n=4$ e 200 μ M, P200, $n=4$) na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com 400 nM de tiamina-³H durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle; C) destes esteróides. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle ($6,13 \pm 0,37$ pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=22$). * $P < 0,05$ vs controle.

B – Modulação nutricional da captação intestinal de tiamina-³H

Efeito de Vitaminas. O TPP (250 μ M) aumentou significativamente o transporte da tiamina-³H, para cerca de 118% relativamente ao respectivo controlo ($7,07 \pm 0,38$ pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=34$). Por outro lado, o ácido fólico (10 μ M, 100 μ M e 200 μ M) inibiu significativamente o referido transporte, de forma dependente da concentração (figura 8). O ácido ascórbico (200 μ M) e a riboflavina (10 μ M) não alteraram significativamente a captação celular da tiamina-³H ($106 \pm 4\%$ do controlo, $n=5$; $97 \pm 3\%$ do controlo, $n=4$, respectivamente). Também na presença de vitamina E (20 μ M e 500 μ M), de fosfato de piridoxal (10 μ M) e de ácido retinóico (10 μ M), a captação de tiamina-³H pelas células Caco-2 não foi significativamente diferente do respectivo controlo ($99 \pm 2\%$, $n=4$; $93 \pm 8\%$, $n=7$; $90 \pm 5\%$, $n=3$; $103 \pm 3\%$, $n=6$, respectivamente).

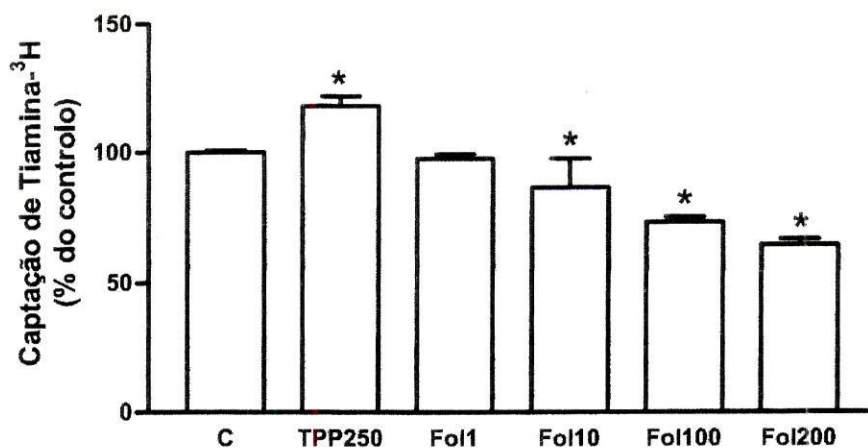


Figura 8 - Efeito do TPP (250 μ M, TPP250, $n=3$) e do ácido fólico (1 μ M, Fol1, $n=2$; 10 μ M, Fol10, $n=2$; 100 μ M, Fol100, $n=4$ e 200 μ M, Fol200, $n=2$) na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controlo; C) destas vitaminas. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controlo ($7,07 \pm 0,38$ pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=34$). * $P < 0,05$ vs controlo.

Efeito de Ácidos aminados. Os ácidos aminados catiónicos arginina e histidina provocaram efeitos contrários na captação de tiamina-³H pelas células Caco-2. Assim, a L-arginina (1 mM) diminuiu de modo significativo a captação de tiamina-³H, e curiosamente, a L-histidina (1 mM e 2 mM) e a D-histidina (1 mM) aumentaram significativamente a captação de tiamina-³H nas células Caco-2, em relação ao respectivo controlo (figura 9).

Uma vez que o transporte intestinal de tiamina é modulado pela actividade da fosfatase alcalina, presente no epitélio intestinal [43], foram testados outros ácidos aminados, não catiónicos, mas descritos como inibidores desta enzima [44]. A L-fenilalanina (1 mM e 2 mM) e a L-serina (1 mM e 2 mM) não modificaram significativamente a captação apical de tiamina-³H (figura 9).

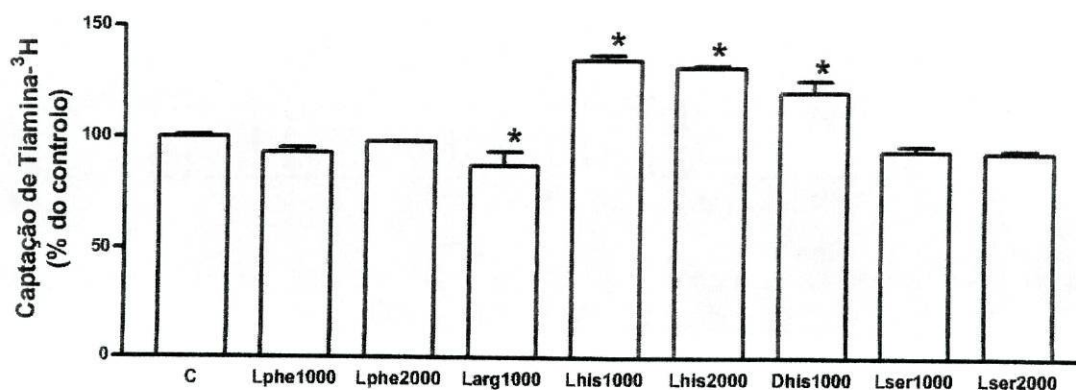


Figura 9 - Efeito da L-fenilalanina (1 mM, Lphe1000, $n=8$ e 2 mM, Lphe2000, $n=2$), da L-arginina (1 mM, Larg1000, $n=4$), da L-histidina (1 mM, Lhis1000, $n=6$ e 2 mM, Lhis2000, $n=2$), da D-histidina (1 mM, Dhis1000, $n=4$), e da L-serina (1 mM, Lser1000, $n=6$ e 2 mM, Lser2000, $n=2$) na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H (400 nM) durante 3 minutos, na presença ou ausência (controlo; C) destes ácidos aminados. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controlo ($7,31 \pm 0,37$ pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=32$). * $P < 0,05$ vs controlo.

Efeito de Ácidos Gordos. Nenhum dos ácidos gordos testados (100 μ M CLA; 50 μ M DHA e 100 μ M ácido oleico) foi capaz de modificar significativamente a captação apical de tiamina-³H, nas células Caco-2 ($98 \pm 0,2\%$, $n=2$; $99 \pm 3\%$, $n=2$;

100±1%, $n=2$, respectivamente), comparativamente ao respectivo controlo (7,31±0,40 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=25$).

Efeito do Etanol. O etanol diminuiu a captação de tiamina-³H pelas células Caco-2, de forma dependente da concentração. Contudo, apenas nas concentrações mais altas testadas, 5% (74±4% do controlo, $n=12$) e 10% (75±6% do controlo, $n=9$), ocorreu uma diminuição significativa em relação ao controlo (7,31±0,37 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=32$) (figura 10).

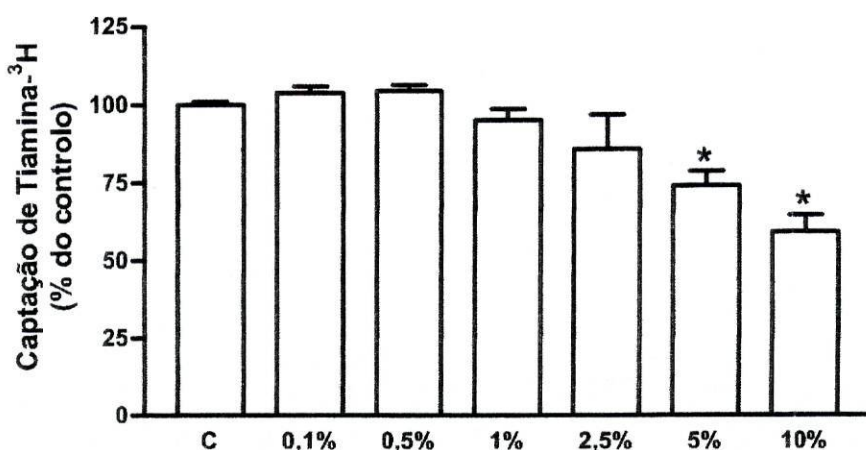


Figura 10 - Efeito do etanol nas concentrações (v/v) de 0,1% ($n=2$), 0,5% ($n=11$), 1% ($n=18$), 2,5% ($n=2$), 5% ($n=12$) e 10% ($n=9$) na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com 400 nM de tiamina-³H durante 3 minutos, na presença ou ausência (controlo; C) do etanol. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controlo (7,31±0,37 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=32$). * $P<0,05$ vs controlo.

Efeito de Compostos Fenólicos. De entre todos os compostos fenólicos testados, apenas a EGCG na concentração de 10 µM diminuiu significativamente a captação celular de tiamina-³H (86±3%, $n=4$) quando comparada com o respectivo controlo (7,31±0,37 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=32$). As diminuições provocadas por este flavanol nas concentrações de 100 µM (98±3%, $n=7$) e 500 µM (97±2%, $n=2$) não foram significativas. O xanto-humol,

nas concentrações de 1 nM ($93\pm 8\%$, $n=3$), 100 nM ($108\pm 4\%$, $n=5$), 1 μM ($105\pm 0,4\%$, $n=2$), 10 μM ($97\pm 1\%$, $n=8$) e 100 μM ($96\pm 6\%$, $n=2$), também não modificou a captação de tiamina em relação ao controlo ($6,13\pm 0,37$ pmol de tiamina- ^3H /mg de proteína por 3 minutos, $n=22$). O mesmo aconteceu com a catequina a 100 μM ($103\pm 2\%$, $n=4$) e epicatequina a 100 μM ($106\pm 4\%$, $n=4$) e 200 μM ($108\pm 2\%$, $n=2$). Para além destes, foram ainda testados o resveratrol nas concentrações de 1 μM ($95\pm 0,4\%$, $n=3$), 10 μM ($91\pm 3\%$, $n=3$) e 100 μM ($94\pm 4\%$, $n=3$), a rutina a 100 μM ($109\pm 8\%$, $n=7$), a quercetina a 100 μM ($92\pm 7\%$, $n=5$), a miricetina a 100 μM ($102\pm 5\%$, $n=4$) e a crisina a 100 μM ($94\pm 2\%$, $n=4$), não se tendo verificado um efeito significativo por parte destes compostos relativamente ao controlo ($7,31\pm 0,40$ pmol de tiamina- ^3H /mg de proteína por 3 minutos, $n=25$).

Efeito de Xantinas. A teofilina, na concentração de 1 mM, diminuiu significativamente a captação celular de tiamina- ^3H (para $81\pm 4\%$ do controlo) quando comparada com o respectivo controlo ($7,31\pm 0,40$ pmol de tiamina- ^3H /mg de proteína por 3 minutos, $n=25$). No entanto, a cafeína, testada na mesma concentração, não modificou significativamente a captação de tiamina- ^3H ($96\pm 3\%$, $n=10$) nas células Caco-2 (figura 11).

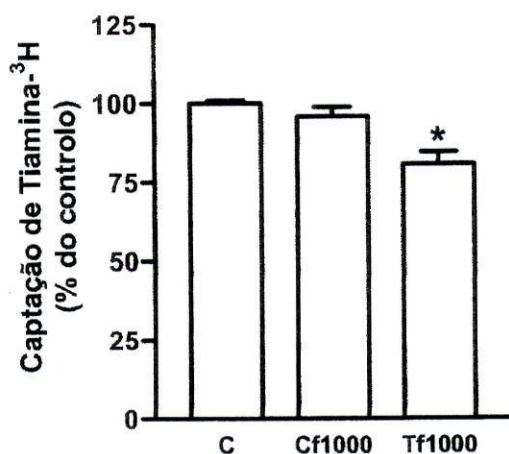


Figura 11 - Efeito da cafeína (1 mM, Cf1000, $n=10$) e da teofilina (1 mM, Tf1000, $n=10$) na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controlo; C) destas xantinas. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controlo ($7,31 \pm 0,40$ pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=25$). * $P < 0,05$ vs controlo.

Efeito de Vinhos. O vinho tinto testado (VT; 500 μ L/mL) diminuiu significativamente o transporte da tiamina-³H, nas células Caco-2 (para $86 \pm 5\%$ do controlo, $n=2$). Por outro lado, o vinho branco testado (VB; 500 μ L/mL) não teve um efeito significativo sobre o referido transporte ($97 \pm 5\%$, $n=2$) (figura 12A). Na concentração de 250 μ L/mL, ambos os vinhos tendiam a diminuir a captação da vitamina, contudo os resultados não foram significativos nem para o VT ($93 \pm 2\%$, $n=3$) nem para o VB ($91 \pm 4\%$, $n=3$) (figura 12B).

No que diz respeito aos vinhos desalcooolizados, verificou-se que tanto o vinho tinto (VTD; 500 μ L/mL) como o vinho branco (VBD; 500 μ L/mL) diminuíram significativamente a captação da tiamina-³H (figura 13A). Os mesmos vinhos testados numa concentração inferior (250 μ L/mL), tiveram um efeito inibitório significativo, embora menos acentuado. Estes resultados sugerem um efeito dependente da concentração (figura 13B).

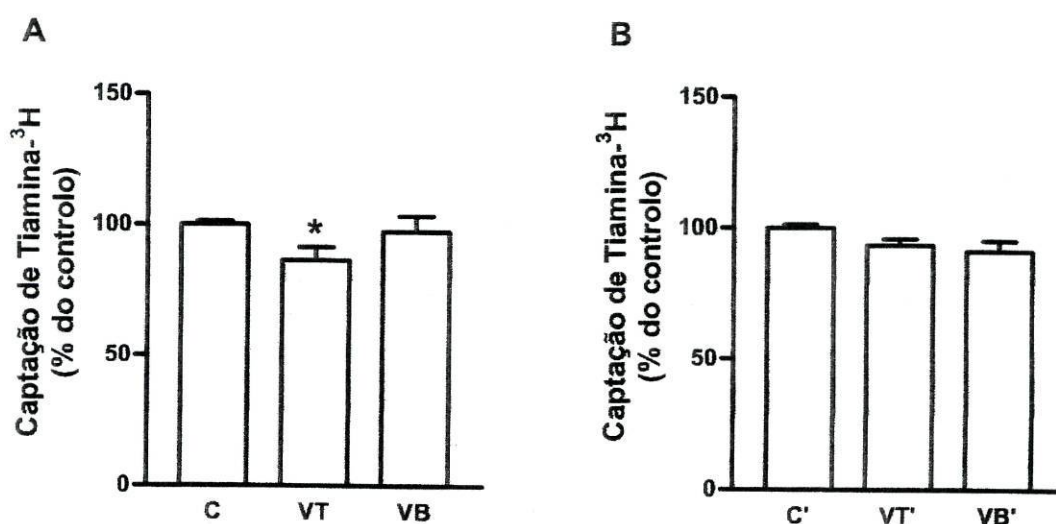


Figura 12 – A – Efeito do vinho tinto (500 µL/mL, VT, $n=6$) e do vinho branco (500 µL/mL, VB, $n=2$), na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle; C) destes vinhos. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle (5,47±0,90 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=6$). **B** – Efeito do vinho tinto (250 µL/mL, VT', $n=3$) e do vinho branco (250 µL/mL, VB', $n=3$), na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle, C') destes vinhos. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle (4,49±0,80 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=4$). * $P<0,05$ vs respectivo controle.

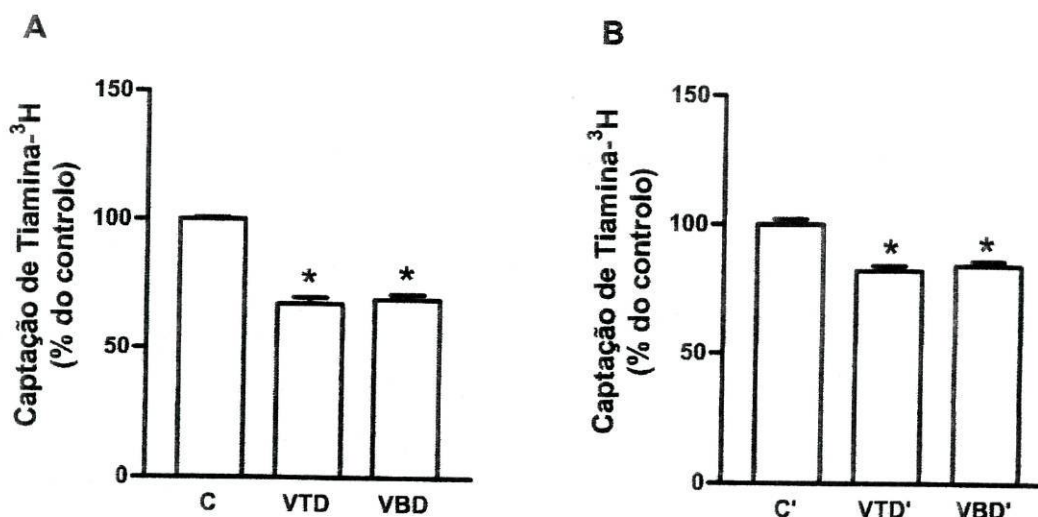


Figura 13 – A – Efeito do vinho tinto desalcooolizado (500 µL/mL, VTD, $n=6$) e do vinho branco desalcooolizado (500 µL/mL, VBD, $n=6$), na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle; C) destes vinhos. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle (5,85±0,59 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=8$). **B** – Efeito do vinho tinto desalcooolizado (250 µL/mL, VTD', $n=4$) e do vinho branco desalcooolizado (250 µL/mL, VBD', $n=4$), na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle; C') destes vinhos. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle (5,98±1,47 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=4$). * $P<0,05$ vs respectivo controle.

Efeito de Cervejas. Nas células Caco-2, as cervejas branca e preta (250 $\mu\text{L/mL}$ e 500 $\mu\text{L/mL}$), inibiram significativamente o transporte de tiamina- ^3H relativamente ao respectivo controlo (figura 14A, 14B).

A cerveja sem álcool (250 $\mu\text{L/mL}$ e 500 $\mu\text{L/mL}$) também inibiu significativamente o transporte de tiamina- ^3H , nestas células (figura 15A, 15B).

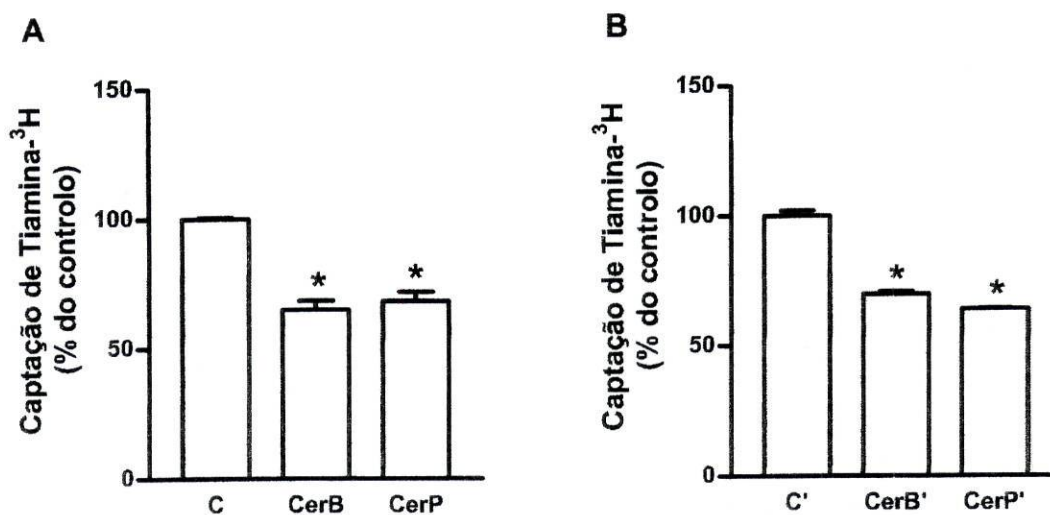


Figura 14 – **A** – Efeito da cerveja branca (500 $\mu\text{L/mL}$, CerB, $n=8$) e da cerveja preta (500 $\mu\text{L/mL}$, CerP, $n=2$) na captação celular de tiamina- ^3H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina- ^3H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controlo; C) das cervejas. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controlo (5,63 \pm 0,87 pmol de tiamina- ^3H /mg de proteína por 3 minutos, $n=8$). **B** – Efeito da cerveja branca (250 $\mu\text{L/mL}$, CerB', $n=4$) e da cerveja preta (250 $\mu\text{L/mL}$, CerP', $n=4$), na captação celular de tiamina- ^3H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina- ^3H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controlo; C') das cervejas. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controlo (5,71 \pm 1,48 pmol de tiamina- ^3H /mg de proteína por 3 minutos, $n=4$). * $P<0,05$ vs respectivo controlo.

Efeito de Chás. O chá preto (CP, 250 $\mu\text{L/mL}$ e 500 $\mu\text{L/mL}$), aumentou significativamente a captação de tiamina- ^3H , nas células Caco-2, numa forma dependente da concentração (figuras 16A e 16B). O chá verde (CV, 500 $\mu\text{L/mL}$) também aumentou significativamente a captação de tiamina- ^3H , no entanto, não foi observado efeito com a menor concentração (250 $\mu\text{L/mL}$) (figuras 16A e 16B).

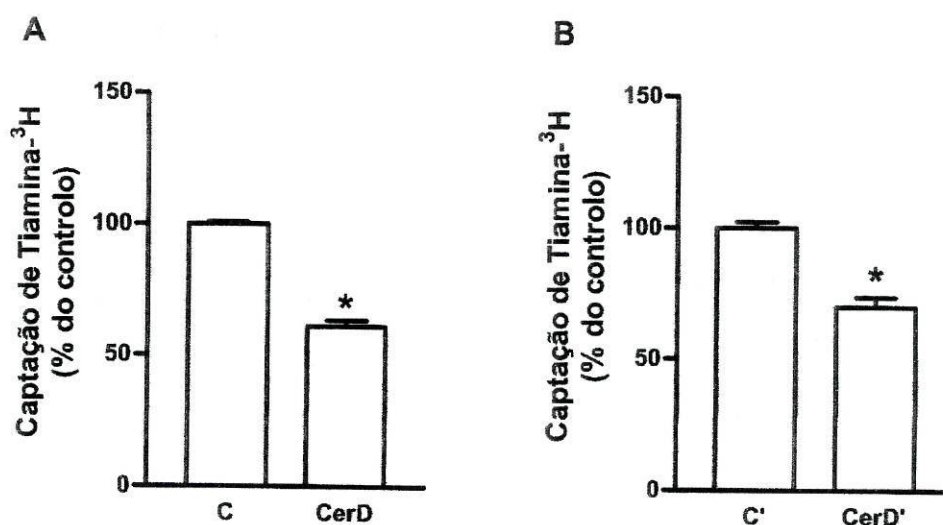


Figura 15 – A – Efeito da cerveja desalcooolizada (500 µL/mL, CerD, $n=4$), na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle; C) destas cervejas. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle (5,85±0,59 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=8$). **B** – Efeito da cerveja desalcooolizada (250 µL/mL, CerD', $n=4$), na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle; C') destas cervejas. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle (5,98±1,47 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=4$). * $P<0,05$ vs controle.

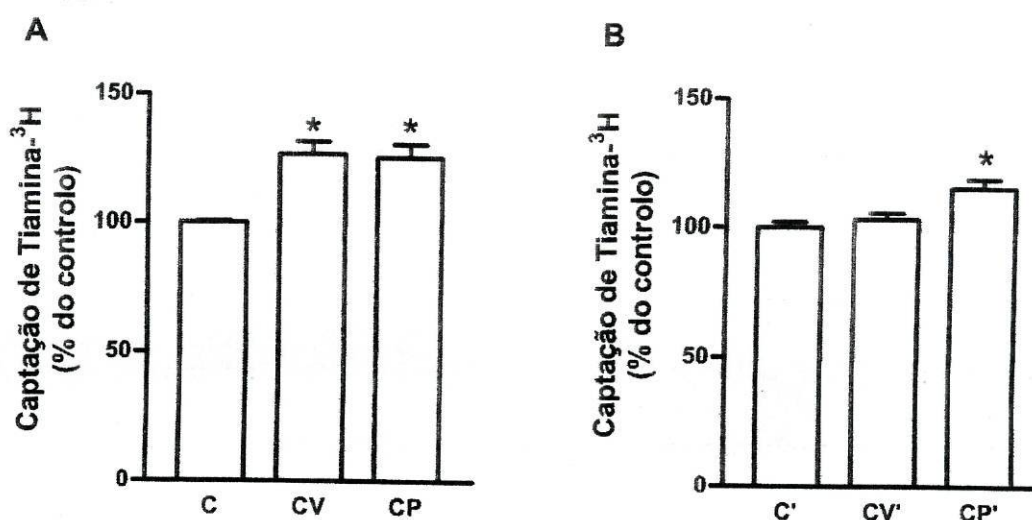


Figura 16 – A – Efeito do chá verde (500 µL/mL, CV, $n=4$) e do chá preto (500 µL/mL, CP, $n=4$), na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle; C) destas bebidas. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle (5,85±0,59 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=8$). **B** – Efeito do chá verde (250 µL/mL, CV', $n=2$) e do chá preto (250 µL/mL, CP', $n=2$), na captação celular de tiamina-³H por células Caco-2. As células foram pré-incubadas durante 20 minutos e incubadas a 37°C com tiamina-³H 400 nM durante 3 minutos, na presença ou ausência (controle; C') destas bebidas. Os resultados são apresentados sob a forma de % do controle (5,98±1,47 pmol de tiamina-³H/mg de proteína por 3 minutos, $n=4$). * $P<0,05$ vs controle.

6. DISCUSSÃO

O interesse pelo transporte intestinal de tiamina surgiu do facto de: (i) farmacologicamente estar insuficientemente caracterizado, tendo sido o primeiro transportador (ThT1, SLC19A2) clonado apenas em 1999 [4] e o segundo, o ThT2 (SLC19A3), em 2000 [9]; (ii) nos ter parecido premente uma informação sobre possíveis interacções fármaco/nutriente, mais detalhada e fundamentada; e (iii) ser necessário o estudo da modulação nutricional para o melhor conhecimento de possíveis interacções alimento/nutriente e nutriente/nutriente.

Pelo facto da tiamina ser um catião, não atravessa livremente as membranas, o que se traduz na necessidade da presença, na membrana plasmática, de transportadores especializados no seu transporte (ThT1 e ThT2).

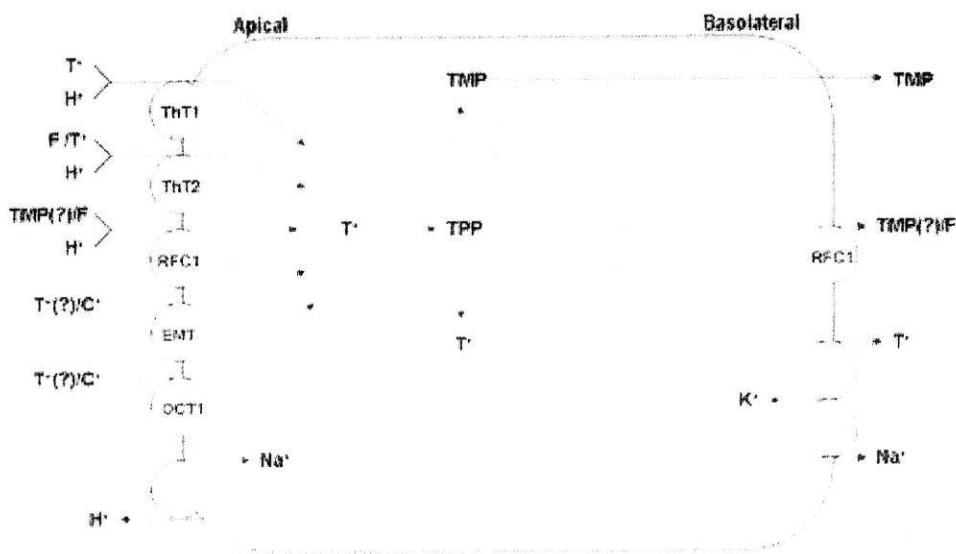
O transporte de tiamina no intestino tem recebido considerável atenção. Estudos no Rato, realizados com vesículas de membranas com bordadura em escova (BBMVs), revelaram que a entrada de tiamina no enterócito é um processo independente do sódio e inibido competitivamente por análogos estruturais da vitamina como o amprólio e a oxitiamina. Em concentrações fisiológicas (inferiores a $1,25 \mu\text{M}$) a tiamina entra no enterócito através dum mecanismo saturável, enquanto que para concentrações mais elevadas prevalece a difusão passiva [6]. À semelhança do que acontece com outros catiões orgânicos, a tiamina é transportada para o interior das BBMVs através de um antiporte tiamina/ H^+ [3]. No que diz respeito à saída da tiamina do enterócito, estudos com vesículas de membrana basolateral revelaram que esta é dependente do sódio e inibida por análogos estruturais da tiamina. Assim, o transporte apical de tiamina, no epitélio intestinal, possui uma componente saturável (para concentrações fisiológicas) e

uma componente não saturável (para concentrações mais elevadas). Para além disto, a ATPase- Na^+ - K^+ parece estar envolvida no transporte basolateral de tiamina [6]. O transporte da tiamina foi também estudado usando como modelo células Caco-2 [7]. A captação de tiamina por estas células é dependente da temperatura e da energia, sensível ao pH e independente do sódio. Envolve um mecanismo saturável, sendo inibido por análogos estruturais da tiamina como o amprólio e a oxitiamina, mas não por outros catiões orgânicos como a colina, o TEA e a NMN [7].

Nos nossos estudos, a captação de tiamina- ^3H pelas células Caco-2 revelou-se independente do sódio e do potencial, uma vez que a substituição (isosmolar) do NaCl, no meio extracelular, por LiCl ou KCl, não foi capaz de provocar alterações significativas nessa mesma captação. A inibição provocada pelo cloreto de colina não parece suficiente para suportar a hipótese deste transporte ser dependente do sódio. Sendo a colina um catião orgânico, é possível que a inibição da captação de tiamina pelo cloreto de colina se deva a uma competição com a tiamina pelo mesmo transportador [45]. No entanto, na presença de concentrações menores de colina (100 μM e 1 mM), não foi observada qualquer alteração significativa deste transporte (resultados não apresentados), o que está de acordo com Said *et al* [7]. Também Martel *et al* [46] descrevem um efeito semelhante da colina, sobre o transporte do catião orgânico MPP $^+$ em células transfectadas com o hEMT. De acordo com estes autores, a colina em concentrações elevadas (125 mM) inibe marcadamente este transporte; no entanto, para concentrações menores (1 μM -1mM) não tem efeito.

Para além disto, a captação intestinal da tiamina- ^3H mostrou ser independente do cloreto, uma vez que a substituição (isosmolar) do NaCl por NaF também não

teve qualquer efeito. Este resultado sugere também que o transporte não é dependente de energia, uma vez que o fluoreto é um inibidor metabólico. Este resultado estará de acordo com Singleton & Martin [12], que descrevem que o transporte de tiamina ocorre por um transporte activo secundário, uma vez que não depende directamente da hidrólise do ATP, mas da fosforilação da tiamina após a sua captação pelas células. Deste modo, será tanto maior a captação celular, quanto maior a fosforilação intracelular de tiamina (Esquema 3).



Esquema 3 – Representação esquemática do transporte de tiamina no epitélio intestinal.

Os nossos resultados sugerem que, nas células Caco-2, o transporte apical de tiamina é um cotransporte tiamina/H⁺ (Esquema 3). Estes resultados não estão de acordo com os descritos por Said *et al* [7]. No entanto, obtivemos dados suficientemente coerentes para justificar esta teoria: (i) a acidificação do meio extracelular aumentou a captação e a alcalinização, por sua vez, reduziu-a; (ii) em estudos de acidificação do meio intracelular, foi observada uma inibição da captação de tiamina; (iii) quando as células foram pré-tratadas com amilorido, um inibidor do trocador Na⁺/H⁺, presente na membrana apical dos enterócitos, a captação de tiamina foi também significativamente menor.

O amilorido, inibidor do trocador Na^+/H^+ , foi capaz de inibir de forma bastante significativa a captação intestinal da tiamina, o que está de acordo com o descrito por Said *et al* [7]. Este resultado parece reforçar a hipótese de se tratar dum cotransporte T^+/H^+ e não dum antiporte, já que, impedindo a extrusão apical de H^+ na presença de amilorido, o transporte de tiamina deveria ser inibido, o que, de facto, se verificou. Tendo presente que o amilorido é um diurético usado na prática clínica, parece importante tentar entender um pouco melhor o significado nutricional desta interacção, sobretudo em pacientes tratados cronicamente com este fármaco. Na realidade, tem sido descrito que o uso crónico de diuréticos pode provocar deficiência de tiamina [20, 21], o que poderá ser explicado pelos nossos resultados, pelo que talvez seja necessária a suplementação com esta vitamina em pacientes submetidos a tratamentos crónicos com estes fármacos.

Os indivíduos com TRMA, que apresentam uma mutação no gene do ThT1 [25-27], têm carência de tiamina a nível de algumas células (carência de tiamina intracelular), o que se traduz num comprometimento do ciclo de Krebs nessas células. Assim, este dado sugere que não existirá apenas um sistema de transporte transmembranar responsável pelo transporte da tiamina em todas as células. Adicionalmente, estes indivíduos apresentam níveis plasmáticos de tiamina normais, o que sugere que também no transporte intestinal de tiamina estejam envolvidos outros transportadores, além do ThT1 [47].

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, o transporte da tiamina em células Caco-2 foi inibido, de modo dependente da concentração, pelos análogos estruturais da tiamina, o amprólio e a oxitiamina, o que sugere o envolvimento de pelo menos um dos transportadores clonados para a tiamina, ThT1 e/ou ThT2 (Esquema 3).

De acordo com Martel *et al* [48, 49], os catiões orgânicos, que constituem um grande grupo de compostos com propriedades variadas, incluindo medicamentos de várias classes terapêuticas, neurotransmissores, algumas vitaminas e aminas biogênicas, são captados no epitélio intestinal por dois transportadores diferentes pertencentes à família dos ASF (*amphiphilic solute facilitator*, facilitador de solutos anfifílicos): o EMT (*extraneuronal monoamine transporter*, transportador extraneuronal de monoaminas) e o OCT1 (*organic cation transporter 1*; transportador de catiões orgânicos 1). De acordo com estes autores [50], o EMT será, provavelmente, o principal transportador envolvido na captação apical de catiões orgânicos, em células Caco-2.

No presente estudo, os catiões orgânicos TEA, colina e NMN, descritos como substratos/inibidores de OCTs, não modificaram o transporte da tiamina, o que está de acordo com outros autores [6, 7]. Foram ainda testados neste trabalho outros substratos/inibidores dos OCTs, nomeadamente a histamina, a cimetidina, a guanidina, a corticosterona e a cianina 863, que não tiveram qualquer efeito sobre o referido transporte. Estes resultados são consistentes com a impossibilidade do transporte intestinal de tiamina ser mediado, também, por um dos OCTs, o que estaria de acordo com Said *et al* [7]. No entanto, a clonidina, o D22 e o MPP⁺, substratos/inibidores dos OCTs, inibiram significativamente o transporte da tiamina-³H, nestas células. Sendo o MPP⁺ um excelente substrato para o OCT1, OCT2 e EMT, e não o sendo para os restantes membros da ASF [51], estes resultados sugerem o possível envolvimento de qualquer um destes no transporte apical de tiamina nas células Caco-2. Curiosamente, a dopamina, catião orgânico e conhecido substrato do OCT2, aumentou significativamente este transporte.

A glicoproteína-P é um transportador de extrusão, presente na membrana apical dos enterócitos [52]. Uma vez que a progesterona inibiu a captação de tiamina e que é um conhecido inibidor da glicoproteína-P [53], surge a hipótese deste transportador também estar envolvido no transporte intestinal de tiamina. No entanto, pelo tempo de incubação escolhido (fase linear), julgamos que, com este modelo experimental, estudámos apenas a entrada de tiamina para as células. Assim, o efeito da progesterona não parece ser resultado dum efeito sobre a glicoproteína-P, até porque o que seria de esperar com uma inibição da glicoproteína-P por esta hormona seria um aumento da acumulação intracelular de tiamina, o que não se verificou.

Assim, os nossos resultados são compatíveis com a possibilidade da tiamina partilhar o(s) mesmo(s) transportador(es) com os restantes catiões orgânicos presentes no intestino (EMT e/ou OCT1) pelas seguintes razões: (i) a tiamina reduz significativamente a captação de catiões orgânicos, nas células Caco-2 [54]; (ii) neste trabalho alguns catiões orgânicos inibem a captação de tiamina-³H; (iii) células transfectadas com o hEMT são capazes de transportar a tiamina [4]; e (iv) existe uma incongruência entre os estudos farmacológicos que revelam uma grande capacidade por parte do intestino para transportar tiamina e os estudos de biologia molecular nos quais a presença do ThT1 no epitélio intestinal não será muito significativa, insuficiente para explicar a elevada capacidade deste tecido para transportar esta vitamina [6].

Sabe-se que o transporte de tiamina em células Caco-2 é regulado por fenómenos de fosforilação/desfosforilação [7]. Deste modo foram testados o DB-AMPC (um activador da PKA [55]), o vanadato (um inibidor das PTPs [56]) e o levamisol (um inibidor da fosfatase alcalina não específica [44]). Todos eles

inibiram significativamente aquele transporte. Estes dados sugerem que os mecanismos de fosforilação/desfosforilação desempenham um papel importante na regulação da captação intestinal de tiamina, nas células Caco-2. Adicionalmente, estes dados estão de acordo tanto com a hipótese dum dos transportadores específicos para a tiamina (ThT1 e/ou ThT2) estar envolvido neste transporte intestinal, como dum dos OCTs, uma vez que todos são regulados por mecanismos de fosforilação/desfosforilação [7, 50].

De acordo com Anderson *et al* [57], os contraceptivos orais afectam o metabolismo de algumas vitaminas, conduzindo, em particular, a uma deficiência em tiamina. Os nossos resultados estão de acordo com aquela afirmação, pois mostram um efeito inibitório dos esteróides sexuais femininos sobre a captação da tiamina.

Das vitaminas testadas, apenas o ácido fólico afectou, negativamente, a captação da tiamina, o que sugere uma interacção entre estas duas vitaminas (e não relativamente às restantes testadas). A riboflavina, sendo um catião orgânico, poderia partilhar um mesmo sistema de transporte que a tiamina; curiosamente não teve efeito, o que sugere que o transportador específico para a riboflavina [58], presente nas células Caco-2, não será responsável pelo transporte de tiamina. Curiosamente, o TPP causou um aumento na captação de tiamina. Pelo significado nutricional do consumo de ácido oleico e de DHA (omega 3), bem como de algumas vitaminas anti-oxidantes (vitaminas C e E), considerou-se importante a informação da possibilidade, ou não, de uma interacção destes com o transporte intestinal de tiamina. Os nossos resultados mostram que, nas concentrações testadas, nenhum daqueles compostos teve efeito sobre a captação intestinal de tiamina.

O CLA é um conjugado de ácidos dienóicos, derivados do ácido linoleico, abundante na carne dos ruminantes. De acordo com alguns autores este tem um efeito benéfico para a saúde, na medida em que é anti-diabético, anti-obesidade, anti-aterogénico e anti-tumoral [59], o que nos levou a testar o seu efeito no transporte celular da tiamina. Nestas condições experimentais, não observámos qualquer efeito.

Pela importância da fosforilação/desfosforilação intracelular da tiamina e dos seus derivados (Esquemas 1 e 2), e ainda porque, de acordo com Ferrari *et al* [43], a inibição da fosfatase alcalina no epitélio intestinal inibe a absorção da tiamina, testámos o efeito de ácidos aminados inibidores da fosfatase alcalina intestinal no transporte da tiamina. Os resultados obtidos com a L-serina e a L-fenilalanina mostram que estes não tiveram efeito sobre a captação desta vitamina. Na verdade, o efeito observado por aqueles autores foi a nível da absorção e não apenas um efeito sobre a captação (o que foi avaliado no nosso estudo).

Uma vez que a deficiência de tiamina, e todas as consequências daí decorrentes, são frequentes nos alcoólicos, e que esta deficiência também acontece mesmo nos alcoólicos que apresentam ingestões adequadas desta vitamina, considerámos importante avaliar o efeito do etanol, *per si*, bem como de algumas bebidas alcoólicas, sobre a captação apical de tiamina no epitélio intestinal. O etanol inibiu, de forma dependente da concentração, o transporte intestinal da tiamina. De acordo com Rindi & Laforenza [6], em estudos realizados em BBMV de Rato, a administração crónica de etanol é capaz de reduzir a captação desta vitamina. Assim, os nossos resultados parecem confirmar que a ingestão de etanol conduz a uma redução na absorção intestinal da tiamina, sendo este um dos mecanismos responsáveis pela deficiência desta vitamina em alcoólicos. No

entanto, não é possível distinguir se o efeito do etanol é um efeito directo, por alteração bioquímica (ex. por inibição da difosfocinase da tiamina [12]) ou por interacção física deste solvente com o(s) transportador(es), ou indirecto, sobre a expressão do gene do(s) transportador(es) e/ou dos níveis da proteína (transportador).

Embora este tenha sido um resultado esperado, consideramos pouco prudente a partir dele concluir que a ingestão de bebidas alcoólicas provoque igualmente uma inibição do transporte de tiamina. De acordo com os nossos resultados, o VT e o VB praticamente não tiveram efeito sobre o transporte da vitamina B₁ nas células Caco-2. Apenas o VT, na concentração de 500 µL/mL, inibiu de forma significativa aquele transporte. Curiosamente, o pré-tratamento das células com os vinhos desalcoolizados (VTD e VBD) provocou uma redução marcada na captação da tiamina-³H. Este efeito inibitório foi, no caso do VTD, maior com o desalcoolizado relativamente ao vinho intacto. Estes resultados parecem pouco coerentes, mas são muito interessantes, sobretudo se tivermos em consideração que o etanol isoladamente inibiu o transporte da vitamina, uma vez que os vinhos, após extracção do álcool, passam a ter um efeito inibitório sobre o transporte de tiamina. Se, por um lado, a observação do efeito inibitório do etanol sobre este transporte não é nova [12], não existem dados na literatura sobre o efeito de bebidas alcoólicas sobre o transporte da tiamina. Daí se ter considerado importante fazê-lo, até porque existem já referências na literatura [60-62] à imprudência de se concluir do efeito da ingestão de bebidas alcoólicas, sobre um qualquer aspecto fisiológico em estudo, com base em estudos realizados apenas com etanol.

Estas bebidas têm em comum o facto de serem ricas em compostos fenólicos. Este grupo de compostos tem sido alvo de variadíssimos estudos, os quais lhes têm atribuído uma grande multiplicidade de propriedades bastante benéficas para a saúde. De entre elas destacam-se, por exemplo, a actividade anti-inflamatória, anti-oxidante, anti-alérgica, anti-vírica, anti-trombótica e anti-carcinogénica [37-39].

De todos os compostos fenólicos presentes no vinho que nós testámos, nenhum teve efeito sobre o transporte em estudo. Estes resultados parecem justificar a ausência de efeito dos vinhos com álcool, mas deixam em aberto a questão dos vinhos desalcoholizados. De facto, parecia-nos que a única diferença entre os vinhos com álcool e os vinhos desalcoholizados fosse precisamente o etanol, no entanto estes resultados mostram que não. Sabe-se que o etanol é o álcool mais importante do vinho, atingindo concentrações de 10-13% no produto final. Durante a fermentação, o etanol permite a extracção dos compostos fenólicos das películas das uvas e actua como um importante solvente para muitos destes compostos [32]. Assim, embora o etanol tenha um efeito inibitório sobre o transporte intestinal da tiamina, é provável que ele desempenhe algum papel na solubilização e biodisponibilidade dos compostos presentes no vinho. De facto, não podemos encarar o vinho como a soma isolada dos seus compostos. Pelo contrário, devemos perceber que, muitas vezes, estes compostos interagem entre si, alterando a biodisponibilidade uns dos outros. Posto isto, podemos concluir que deverá haver alguma prudência quando se fazem extrapolações de resultados obtidos com etanol e se generalizam as conclusões para as bebidas alcoólicas.

No que diz respeito à cerveja, não se verificaram grandes diferenças entre a cerveja branca, a cerveja preta e a cerveja sem álcool, dado que foram todas capazes de inibir significativamente o transporte intestinal da tiamina.

O xanto-humol é um composto fenólico presente na cerveja, ao qual têm sido atribuídas, entre outras, propriedades anti-carcinogénicas [63]. Quando, nas concentrações testadas (1 nM a 100 μ M), este composto não teve qualquer efeito sobre o transporte intestinal da tiamina concluímos que os resultados obtidos com a cerveja não se poderão atribuir, provavelmente, ao xanto-humol. No entanto, julgamos mais prudente não avançar com certezas em relação aos efeitos dos compostos testados isoladamente, pelas mesmas razões que não o devemos fazer com o etanol.

O ácido fólico é uma vitamina do complexo B que, apesar de ser um anião, tem em comum com a tiamina o facto dos respectivos transportadores pertencerem à mesma família [4, 29]. Por este facto, bem como pelo facto de existir em quantidades apreciáveis nas cervejas, foi testado o ácido fólico em várias concentrações (1 μ M a 200 μ M). Os resultados obtidos mostram que o ácido fólico foi capaz de inibir, de forma dependente da concentração, a captação intestinal da tiamina, o que está de acordo com Rindi & Laforenza [6]. Assim, o efeito inibitório da cerveja poderá ser explicado, pelo menos em parte, pelo seu conteúdo em ácido fólico. Também este resultado reforça a hipótese da tiamina, nestas células, ser transportada por outro(s) transportador(es), que não o ThT1, uma vez que, de acordo com Zhao *et al* [64] este transportador não é inibido pelo ácido fólico.

Nos últimos tempos tem-se assistido a uma invasão do mercado por variadas bebidas que incluem na sua composição chá verde e/ou chá preto. Não será

certamente alheio a isto o facto de estarem a surgir cada vez mais evidências dos efeitos protectores dos mesmos, nomeadamente no que diz respeito ao cancro e à doença cardiovascular [33, 34, 36]. Tanto o chá verde como o chá preto aumentaram significativamente, e de uma forma dependente da concentração, o transporte intestinal da vitamina B₁. No que diz respeito à sua composição em compostos fenólicos, existem algumas diferenças entre os dois chás: o CV é principalmente rico em flavanóis ou catequinas, como a epicatequina, a epigallocatequina, a epicatequina-3-galato e a EGCG (estes e outros polifenóis constituem cerca de 30% do peso seco do chá verde). Durante o processo de fabrico do chá preto, nomeadamente durante a fermentação, ocorre uma redução no conteúdo em catequinas (o chá preto contém apenas cerca de 20-30% do conteúdo total de catequinas do chá verde), uma vez que estas são convertidas em novos produtos como as teaflavinas e as tearrubiginas [33, 65]. Contudo, estas diferenças de composição não são, certamente, responsáveis pelos efeitos observados, pois todos os compostos fenólicos testados não alteraram significativamente a captação intestinal da tiamina-³H. Apenas a EGCG, que é o principal composto fenólico presente no chá verde [33], na concentração de 10 µM, foi capaz de inibir significativamente a captação intestinal da vitamina; no entanto, nas concentrações de 100 µM e 500 µM, não teve um efeito significativo. Se considerarmos que o chá tem cerca de 2 mM de EGCG [33], talvez assumam maior relevância os resultados obtidos com as concentrações mais elevadas. Estes resultados parecem sugerir que o efeito provocado pelos dois tipos de chá não deverá ser atribuído aos seus compostos fenólicos, ou pelo menos, a nenhum daqueles que testámos.

A teofilina é uma das xantinas presentes no chá. Contudo, este composto inibiu a captação intestinal da tiamina, pelo que não poderá justificar também os resultados obtidos com a bebida. A teofilina é um inibidor das fosfodiesterases, o que implicará um aumento dos níveis intracelulares de AMPc. Logo, este resultado estaria de acordo com o obtido com o DB-AMPc. No entanto, a cafeína, também inibidor das fosfodiesterases, não teve qualquer efeito, o que poderá indicar outro alvo que não a fosfodiesterase para a acção da teofilina.

A histidina e a arginina foram testadas por serem ambos ácidos aminados catiónicos. No entanto, só a arginina foi capaz de reduzir o transporte de tiamina e, curiosamente, a histidina aumentou-o significativamente. Embora se trate de pura especulação, será talvez possível tentar explicar o aumento provocado pelo chá com base neste resultado, uma vez que no chá os ácidos aminados representam 4% do peso seco. Por outro lado, não podemos excluir a hipótese de, à semelhança daquilo que sugerimos para o vinho, os compostos actuarem sinergicamente, como foi já referido por Paquay *et al* [65], não podendo os resultados obtidos com o chá serem explicados pelo efeito isolado de cada composto.

Com base nestes resultados poderemos também especular sobre o impacto nutricional destas bebidas sobre a proliferação tumoral. Uma vez que o acesso de tiamina às células tumorais é um aspecto importante no controlo da proliferação celular (Esquema 2), a modulação do seu transporte para as células neoplásicas será um alvo terapêutico a considerar. De facto, deverá ser considerada a possibilidade do(s) transportador(es) responsáveis pelo transporte de tiamina nas células tumorais ser(em) inibidos/activados da mesma forma que o transporte intestinal.

7. CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que:

- (i) a captação apical de tiamina em células intestinais é mediada por um transportador;
- (ii) a captação apical de tiamina, nas células Caco-2, é independente do sódio, do cloreto e do potencial e dependente do pH;
- (iii) o transporte apical é um cotransporte T^+/H^+ ;
- (iv) o transporte é diferentemente afectado pelos vários catiões orgânicos, conhecidos substratos/inibidores dos OCTs (ex. MPP^+ , D22) e da glicoproteína-P (ex. progesterona). Os resultados obtidos com este trabalho são compatíveis com a possibilidade da tiamina partilhar o mesmo transportador com os restantes catiões orgânicos presentes no intestino (EMT e/ou OCT1);
- (v) pelo menos um dos membros da família RFC, o ThT1 ou o ThT2, estará envolvido no transporte intestinal de tiamina, uma vez que o transporte é inibido pelos conhecidos inibidores destes transportadores (ex. amprólio e oxitiamina);
- (vi) neste transporte poderá estar envolvido mais que um transportador – ThT1 ou ThT2 e um, ou mais, membros da ASF, provavelmente o EMT.

Os efeitos aqui descritos sobre as bebidas testadas, mostrando que, à excepção do vinho branco, alteram significativamente o transporte intestinal de tiamina, deverão ser aprofundados no sentido de se tirarem as pertinentes ilações quanto às dietas a recomendar.

8. BIBLIOGRAFIA

1. Said HM, Ortiz A, Subramanian VS, Neufeld EJ, Moyer MP, Dudeja PK. Mechanism of thiamine uptake by human colonocytes: studies with cultured colonic epithelial cell line NCM460. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281(1):G144-G50.
2. Said HM, Reidling JC, Ortiz A. Cellular and molecular aspects of thiamin uptake by human liver cells: studies with cultured HepG2 cells. *Biochim Biophys Acta* 2002;1567(1-2):106-12.
3. Laforenza U, Orsenigo MN, Rindi G. A thiamine/H⁺ antiport mechanism for thiamine entry into brush border membrane vesicles from rat small intestine. *J Membr Biol* 1998;161(2):151-61.
4. Dutta B, Huang W, Molero M, Kekuda R, Leibach FH, Devoe LD, Ganapathy V, Prasad PD. Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family. *J Biol Chem* 1999;274(45):31925-9.
5. Gastaldi G, Cova E, Verri A, Laforenza U, Faelli A, Rindi G. Transport of thiamin in rat renal brush border membrane vesicles. *Kidney Int* 2000;57(5):2043-54.
6. Rindi G, Laforenza U. Thiamine intestinal transport and related issues: recent aspects. *Proc Soc Exp Biol Med* 2000;224(4):246-55.
7. Said HM, Ortiz A, Kumar CK, Chatterjee N, Dudeja PK, Rubin S. Transport of thiamine in human intestine: mechanism and regulation in intestinal epithelial cell model Caco-2. *Am J Physiol* 1999;277(4 Pt 1):C645-51.

8. Lo PK, Wang FF. Identification of transcriptional start sites and splicing of mouse thiamine transporter gene THTR-1 (Slc19a2). *Biochim Biophys Acta* 2002;1576(1-2):209-13.
9. Eudy JD, Spiegelstein O, Barber RC, Wlodarczyk BJ, Talbot J, Finnell RH. Identification and characterization of the human and mouse SLC19A3 gene: a novel member of the reduced folate family of micronutrient transporter genes. *Mol Genet Metab* 2000; 71(4):581-590.
10. Rindi G, Ricci V, Gastaldi G, Patrini C. Intestinal alkaline phosphatase can transphosphorylate thiamin to thiamin monophosphate during intestinal transport in the rat. *Arch Physiol Biochem* 1995;103(1):33-8.
11. Brody T. *Nutritional biochemistry*. 2nd ed. San Diego: Academic Press; 1999.
12. Singleton CK & Martin PR. Molecular mechanisms of thiamine utilization. *Curr Mol Med* 2001;1:197:207.
13. Comin-Anduix B, Boren J, Martinez S, Moro C, Centelles JJ, Trebukhina R, *et al*. The effect of thiamine supplementation on tumour proliferation. A metabolic control analysis study. *Eur J Biochem* 2001;268(15):4177-82.
14. Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC, editors. *Modern nutrition in health and disease*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999.
15. Stipanuk MH. *Biochemical and physiological aspects of human nutrition*. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 2000.
16. Tallaksen CM, Bell H, Bohmer T. The concentration of thiamin and thiamin phosphate esters in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Alcohol Alcohol* 1992;27(5):523-30.
17. Saito N, Kimura M, Kuchiba A, Itokawa Y. Blood thiamine levels in outpatients with diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol* 1987;33(6):421-30.

18. Thompson AD. The absorption of sulfur-labeled thiamine hydrochloride in control subjects and in patients with intestinal malabsorption. *Clin Sci* 1996;31:167-79.
19. Pietrzak I, Baczyk K, Mlynarczyk M, Kaczmarek M. Content of thiamin in plasma and erythrocytes in patients with end stage renal disease. *Przegl Lek* 1996;53(5):423-6.
20. Seligmann H, Halkin H, Rauchfleisch S, Kaufmann N, Motro M, Vered Z, Ezra D. Thiamine deficiency in patients with congestive heart failure receiving long-term furosemide therapy: a pilot study. *Am J Med* 1991;91(2):151-5.
21. Zangen A, Botzer D, Zangen R, Shainberg A. Furosemide and digoxin inhibit thiamine uptake in cardiac cells. *Eur J Pharmacol* 1998;361(1):151-5.
22. Nichols HK, Basu TK. Thiamin status of the elderly: dietary intake and thiamin pyrophosphate response. *J Am Coll Nutr* 1994;13(1):57-61.
23. Rindi G, Patrini C, Laforenza U, Mandel H, Berant M, Viana MB, Poggi V, Zarra AN. Further studies on erythrocyte thiamin transport and phosphorylation in seven patients with thiamin-responsive megaloblastic anaemia. *J Inherit Metab Dis* 1994;17(6):667-77.
24. Viana MB, Carvalho RI. Thiamine-responsive megaloblastic anemia, sensorineural deafness, and diabetes mellitus: A new syndrome? *J Pediatr* 1978;93(2):235-8.
25. Diaz GA, Banikazemi M, Oishi K, Desnick RJ, Gelb BD. Mutations in a new gene encoding a thiamine transporter cause thiamine-responsive megaloblastic anaemia syndrome. *Nat Genet* 1999;22(3):309-12.
26. Fleming JC, Tartaglino E, Steinkamp MP, Schorderet DF, Cohen N, Neufeld EJ. The gene mutated in thiamine-responsive anaemia with diabetes and deafness

- (TRMA) encodes a functional thiamine transporter. *Nat Genet* 1999;22(3):305-8.
27. Labay V, Raz T, Baron D, Mandel H, Williams H, Barrett T, Szargel R, McDonald L, Shalata A, Nosaka K, Gregory S, Cohen N. Mutations in SLC19A2 cause thiamine-responsive megaloblastic anaemia associated with diabetes mellitus and deafness. *Nat Genet* 1999;22(3):300-4.
28. Dixon KH, Lanpher BC, Chiu J, Kelley K, Cowan KH. A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. *J Biol Chem* 1994;269(1):17-20.
29. Ganapathy V, Smith SB, Prasad PD. SLC19: the folate/thiamine transporter family. *Pflugers Arch*. In press 2003.
30. Rajgopal A, Edmondson A, Goldman ID, Zhao R. SLC19A3 encodes a second thiamine transporter ThTr2. *Biochim Biophys Acta* 2001;1537(3):175-8.
31. Reidling JC, Subramanian VS, Dudeja PK, Said HM. Expression and promoter analysis of SLC19A2 in the human intestine. *Biochim Biophys Acta* 2002;1561(2):180-7.
32. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 1997;11(5):287-313.
33. Mukhtar H, Ahmad N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *Am J Clin Nutr* 2000;71(6 Suppl):1698S-702S.
34. Trevisanato SI, Kim YI. Tea and health. *Nutr Rev* 2000;58(1):1-10.
35. van de Wiel A, van Golde PHM, Hart HC. Blessings of the grape. *Eur J Int Med* 2001;12:484-9.

36. Yang CS, Maliakal P, Meng X. Inhibition of carcinogenesis by tea. *Annu Rev Pharmacol* 2002;42:25-54.
37. Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. *Nutr Rev* 1998;56(11):317-33.
38. Middleton E Jr, Kandaswami C, Theoharides TC. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacol Rev* 2000;52(4):673-751.
39. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001;74(4):418-25.
40. Delie F, Rubas W. A human colonic cell line sharing similarities with enterocytes as a model to examine oral absorption: advantages and limitations of the Caco-2 model. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 1997;14(3):221-86.
41. Bertrand A, Ribereau-Gayon P. Determination of volatile components of wine by gas-phase chromatography. *Ann Fals Expert Chim* 1970;63:148-56.
42. Bradford MM. A rapid method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
43. Ferrari G, Rindi G, D'Andrea G. The action of inorganic phosphate on thiamine transport by rat everted jejunal sacs. *Pflügers Archiv* 1978;376:47-53.
44. Van Hoof VO, De Broe ME. Interpretation and clinical significance of alkaline phosphatase isoenzyme patterns. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1994;31(3):197-293.
45. Yoshioka K, Nishimura H, Himukai M, Iwashima A. The inhibitory effect of choline and other quaternary ammonium compounds on thiamine transport in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* 1985;815(3):499-504.

46. Martel F, Keating E, Azevedo I. Effect of P-glycoprotein modulators on the human extraneuronal monoamine transporter. *Eur J Pharmacol* 2001;422:31-7.
47. Oishi K, Hofmann S, Diaz GA, Brown T, Manwani D, Ng L, *et al.* Targeted disruption of Slc19a2, the gene encoding the high-affinity thiamine transporter ThTr-1, causes diabetes mellitus, sensorineural deafness and megaloblastosis in mice. *Human Mol Gen* 2002;11(23):2951-2960.
48. Martel F, Calhau C, Azevedo I. Characterization of the transport of the organic cation [³H]MPP⁺ in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000;361(5):505-13.
49. Martel F, Grundemann D, Calhau C, Schomig E. Apical uptake of organic cations by human intestinal Caco-2 cells: putative involvement of ASF transporters. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2001;363(1):40-9.
50. Martel F, Keating E, Calhau C, Azevedo I. Uptake of ³H-1-methyl-4-phenylpyridinium (³H-MPP⁺) by human intestinal Caco-2 cells is regulated by phosphorylation/dephosphorylation mechanisms. *Biochem Pharmacol* 2002;63(8):1565-73.
51. Gründemann D, Liebich G, Kiefer N, Köster S, Schömig E. Selective substrates for non-neuronal monoamine transporters. *Mol Pharmacol* 1999;56:1-10.
52. Bellamy WT. P-glycoprotein and multidrug resistance. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996;36:161-83.
53. Martel F, Martins MJ, Hipólito-Reis C, Azevedo I. Inward transport of [³H]-1-methyl-4-phenylpyridinium in rat isolated hepatocytes: putative involvement of a P-glycoprotein transport. *Br J Pharmacol* 1996; 119(8):1519-24.
54. Calhau C, Martel F, Hipólito-Reis C, Azevedo I. Effect of thiamine on ³H-MPP⁺ uptake by Caco-2 cells. *Pharm Res.* In press 2003.

55. Hohage H, Stachon A, Feidt C, Hirsch JR, Schlatter E. Regulation of organic cation transport in IHKE-1 and LLC-PK1 cells. Fluorometric studies with 4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;286(1):305-10.
56. Seargeant LE, Stinson RA. Inhibition of human alkaline phosphatase by vanadate. *Biochem J* 1979;181:247-250.
57. Anderson KE, Bodansky O, Kappas A. Effects of oral contraceptives on vitamin metabolism. *Adv Clin Chem* 1976;18:247-87.
58. Said HM, Ma TY. Mechanism of riboflavine uptake by Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 1994;266(1 Pt 1):G15-21.
59. Majumder B, Wahle KWJ, Moir S, Schofield A, Choe S-N, Farquharson A et al. Conjugated linoleic acids (CLAs) regulate the expression of key apoptotic genes in human breast cancer cells. *FASEB J* 2002;16:1447-49.
60. Corder R, Douthwaite JA, Lees DM, Khan NQ, Santos ACV, Wood EG, Carrier MJ. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. *Nature* 2001;414:863-864.
61. Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The "French paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Rad Biol Med* 2002;32(4):314-18.
62. Monteiro R, Calhau C, Martel F, Guedes de Pinho P, Oliveira J, Azevedo I. Intestinal uptake of organic cations is differently affected by red and white wines. (submitted).
63. Gerhauser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauff J, Neumann I, Scherf HR, Frank N, Bartsch H, Becker H. Cancer chemopreventive activity of Xanthohumol, a natural product derived from hop. *Mol Cancer Ther* 2002;1(11):959-69.

64. Zhao R, Gao F, Wang Y, Diaz GA, Gelb BD, Goldman ID. Impact of the reduced folate carrier on the accumulation of active thiamine metabolites in murine leukemia cells. *J Biol Chem* 2001;276:1114-1118.
65. Paquay JB, Haenen GR, Stender G, Wiseman SA, Tijburg LB, Bast A. Protection against nitric oxide toxicity by tea. *J Agric Food Chem* 2000;48(11):5768-72.

Este trabalho foi financiado pelo iBeSa e pelo projecto POCTI/FCB/37278/2001.

Gostaríamos de agradecer ao iBeSa pelo apoio financeiro e ainda à Doutora Paula guedes de Pinho e ao Doutor J. Oliveira da Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica do Porto pela extracção do etanol na preparação dos vinhos desalcoholizados.