

Nível de Tiamina no Miocárdio, Área Transversa e Número de Núcleos de Cardiomiócitos de Ratos em uso de Furosemida

Artigo Original

1

Myocardial Thiamine Level, Cardiomyocyte Cross-Sectional Area and Nuclei Number in Furosemide-Treated Rats

Sérgio da Cunha, Vera Lúcia Freire da Cunha Bastos, Jayme da Cunha Bastos, João Bosco Salles, Cristiane Martins Cardoso Salles, Maria Cristina da Costa e Silva, Roosevelt Aguiar Dias, Lin Machado de Lima, Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Objetivo: Avaliar os níveis miocárdicos de tiamina e área transversa e número de núcleos de cardiomiócitos de ratos em uso de furosemida.

Métodos: 24 ratos foram estratificados em 4 grupos: 2 grupos receberam furosemida por via intraperitoneal e 2 receberam solução salina, por 21 dias. Dois destes grupos receberam ração-padrão, e 2 ração pobre em tiamina. Os níveis miocárdicos de tiamina foram avaliados por: dosagem de tiamina pirofosfato (TPP) por HPLC, e medidas de atividade da transcetolase miocárdica (ATm) e do efeito da tiamina pirofosfato (ETPP). Métodos estereológicos foram utilizados para a obtenção da área transversa (Acmy) e número de núcleos (Ncmy) dos cardiomiócitos.

Resultados: as médias e desvios-padrão de TPP, ATm, ETPP, Acmy e Ncmy foram, respectivamente: Grupo 1 – 133,7±17,9ng/100µl de tecido homogeneizado; 1731±200µg.hexose/ml/h; 3,6±1,9%; 808±80µm²; 54±8 milhões; Grupo 2 – 160,2±23,2ng/100µl de tecido homogeneizado; 1634±137µg.hexose/ml/h; 2,2±1,4%; 961±59µm²; 63±2 milhões; Grupo 3 – 73,5±8,6ng/100µl de tecido homogeneizado; 715±123µg.hexose/ml/h; 39,8±9,8%; 963±92µm²; 59±4 milhões; Grupo 4 – 82,1±9,9ng/100µl de tecido homogeneizado; 863±75µg.hexose/ml/h; 26,2±11,9%; 1061±33µm²; 63±5 milhões.

Conclusão: A furosemida não reduziu o nível de tiamina no miocárdio, nem alterou a área transversa e o número de núcleos de cardiomiócitos nos animais estudados.

Palavras-chave: Tiamina, Furosemida, Estereologia

Objective: To analyze myocardial thiamine levels and cardiomyocyte cross-sectional area and nuclei number in furosemide treated rats.

Methods: 24 rats were stratified into 4 groups: 2 groups were treated with intraperitoneal furosemide and the other 2 were treated with saline solution for 21 days. Two of these 4 groups received standard chow while the other two received thiamine-deficient chow. Myocardial thiamine levels were analyzed according to: thiamine pyrophosphate (TPP) quantification by HPLC, and myocardial transketolase activity (mTA) and thiamine pyrophosphate effect (TPPE) determinations. Stereological methods were used to obtain cardiomyocyte cross-sectional area (Acmy) and nuclei number (Ncmy).

Results: Means and standard-deviations of TPP, mTA, TPPE, Acmy and Ncmy were, respectively: Group 1 – 133.7±17.9ng/100µl of homogenized tissue; 1731±200µg.hexose/ml/h; 3.6±1.9%; 808±80µm²; 54±8 million; Group 2 – 160.2±23.2ng/100µl of homogenized tissue; 1634±137µg.hexose/ml/h; 2.2±1.4%; 961±59µm²; 63±2 million; Group 3 – 73.5±8.6ng/100µl of homogenized tissue; 715±123µg.hexose/ml/h; 39.8±9.8%; 963±92µm²; 59±4million; Group 4 – 82.1±9.9ng/100µl of homogenized tissue; 863±75µg.hexose/ml/h; 26.2±11.9%; 1061±33µm²; 63±5 million.

Conclusion: Furosemide neither reduced myocardial thiamine level nor altered cardiomyocyte cross-sectional area or nuclei number in the studied animals.

Key words: Thiamine, Furosemide, Stereology

Endereço para correspondência: mandarim@uerj.br

Carlos Alberto Mandarim-de-Lacerda | Laboratório de Morfometria e Morfologia Cardiovascular, Centro Biomédico, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) | Av 28 de Setembro 87 (fundos) | Rio de Janeiro, RJ, Brasil | 20551-030

Recebido em 22/04/2006 | Aceito em 9/05/2006

A deficiência de tiamina resulta em aumento de piruvato e de lactato no sangue, em queda da energia celular e em menor poder redutor no interior da célula, o que a deixa mais vulnerável aos processos oxidantes (peroxidação dos lipídeos da membrana celular, das proteínas e do DNA). Baixa de tiamina está associada a alterações das funções dos sistemas cardiovascular, muscular, nervoso e gastrointestinal¹. Ocorre mais freqüentemente nos pacientes renais submetidos à diálise, nos pacientes recebendo nutrição parenteral, nos pacientes hipermetabólicos e, segundo alguns autores, naqueles com insuficiência cardíaca congestiva tratados com o diurético furosemida²⁻⁸.

Além dos efeitos adversos já bem conhecidos decorrentes do uso prolongado dos diuréticos, a possibilidade de indução de deficiência de tiamina tem sido relatada desde 1978^{8,9}. Desde então, poucos estudos avaliaram a importância clínica desta indução. São possíveis as seguintes explicações para a deficiência de tiamina induzida pelo uso prolongado de furosemida: 1) ingestão inadequada de tiamina devido à anorexia causada pela furosemida¹⁰; 2) redução da absorção intestinal da tiamina, causada pela hiponatremia induzida pela furosemida¹¹; 3) redução da captação e utilização celular da tiamina pela hiponatremia e hipomagnesemia secundárias ao uso da furosemida¹²⁻¹⁴; 4) aumento da excreção urinária da tiamina promovida pela furosemida^{15,16}.

Recentemente, verificou-se o nível de tiamina em ratos em crescimento, submetidos a doses intraperitoneais de furosemida de 10mg/kg/dia, 20mg/kg/dia e 30mg/kg/dia por 21 dias¹⁷. Só os animais submetidos às doses de 20mg/kg/dia e 30mg/kg/dia apresentaram deficiência de tiamina. Em humanos foi observada deficiência de tiamina em um terço dos cardiopatas que faziam uso de furosemida, em doses que variaram de 20mg/dia a 120mg/dia^{18,19}.

Uma vez que este ainda é um tema polêmico, o objetivo deste estudo foi estabelecer se a furosemida pode causar deficiência miocárdica de tiamina e, como consequência, alterações na área transversa e no número de núcleos de cardiomiócitos de ratos adultos.

Quadro 1

Uso de tiamina e furosemida nos grupos estudados

Grupos	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Tiamina	sim	sim	não	não
Furosemida (30mg.kg ⁻¹ .dia ⁻¹)	sim	não	sim	não
NaCl 0,9% (3mL.kg ⁻¹ .dia ⁻¹)	não	sim	não	sim

Métodos

O experimento

Vinte e quatro ratos Wistar machos, com 75 dias de vida, pesando em média 250g, foram estratificados em quatro grupos e alojados em gaiolas individuais. Todos os animais foram alimentados, nos primeiros sete dias do experimento, com a ração AIN 93M completa²⁰, produzida por Rhostrer Indústria e Comércio, SP, Brasil, contendo 5mg de tiamina/kg de ração – concentração que foi confirmada por cromatografia líquida com alta resolução (HPLC). Após este período de adaptação e equilíbrio dos níveis de tiamina ingeridos, os Grupos 1 e 2 continuaram sendo alimentados com ração AIN 93M completa, enquanto os Grupos 3 e 4 receberam a mesma ração, mas deficiente em tiamina (0,63mg/kg de ração). Foi feito o pareamento da ingestão diária de ração do Grupo 1 com o Grupo 2 e do 3 com o 4. Os animais dos Grupos 1 e 3 receberam por via intraperitoneal, diariamente, a partir do 8º dia, por 21 dias, 30mg de furosemida (Lasix, Aventis) por kg de peso, enquanto os animais dos Grupos 2 e 4 receberam igual volume de solução salina (NaCl 0,9%), pela mesma via (Quadro 1).

Foram verificados o peso e a pressão arterial (pletismografia da cauda) dos animais a cada sete dias. Vinte e quatro horas após a 21ª injeção, os animais foram sacrificados sob anestesia com tiopental sódico, por via intraperitoneal, na dose de 20mg/kg de peso.

Após a abertura do tórax, os corações foram perfundidos com solução salina gelada (6ml/min), por 10min, através de punção do ventrículo esquerdo e uso de bomba peristáltica. Seguiu-se a extração do coração, que foi pesado, seguindo-se a retirada de fragmentos do ventrículo esquerdo para a determinação dos níveis de tiamina e a inclusão do restante do órgão em formalina para posterior processamento histológico.

Quantificação de TPP e atividade de transcetolase

Fragmentos do miocárdio foram homogeneizados em cinco volumes de tampão fosfato de potássio 0,1M, pH7,5. O homogeneizado foi centrifugado a 16.000 x g por 30min a 5°C. O sobrenadante resultante foi usado para a quantificação da tiamina pirofosfato (TPP), para a determinação da atividade

da transcetolase miocárdica (ATm - enzima que tem a TPP como co-fator) e do efeito da TPP sobre a ATm (ETPP - percentual de aumento da atividade da enzima após o acréscimo de TPP à amostra). As medidas da ATm e da TPPE foram feitas segundo a técnica descrita para eritrócitos²¹. Para a quantificação da TPP, o sobrenadante foi desproteinizado pela adição de TCA. Após 1 hora de repouso, protegida da luz, a mistura foi centrifugada a $14.000 \times g$ por 30min. O TCA foi extraído com cinco volumes de éter etílico saturado com água. A fração aquosa inferior contendo tiamina foi coletada e derivada pela adição de $50\mu\text{l}$ de ferricianeto de potássio (30,4mM) e $50\mu\text{l}$ de hidróxido de sódio 0,8M por mL de alíquota, formando-se o derivado de tiocromo da tiamina. A separação e a quantificação da TPP foram feitas pela aplicação de $100\mu\text{l}$ desta solução em uma coluna de Hichrom Kromasil 100-5NH₂ acoplada a um sistema de HPLC Shimadzu, constituído por bomba LC-10AD, válvula FCV-10AL, detector de fluorescência RF-535. O diagnóstico de deficiência de tiamina no coração foi definido pela presença simultânea de nível baixo de TPP e ATm, com ETPP superior a 15%²².

Microscopia de luz e Estereologia

Fragmentos do miocárdio foram fixados em formalina pH7,2 e 0,1M em tampão fosfato, por 48 horas e incluídos em Paraplast Plus (*Sigma-Aldrich, St Louis, USA*). O material foi seccionado com espessuras de $3\mu\text{m}$ e $10\mu\text{m}$ e processado para estudo em microscopia de luz. Os cortes foram corados com HE e tricrômico de Masson.

Para a obtenção dos fragmentos de miocárdio, optou-se pelo método "orientator"²³, que consiste na secção do coração em sucessivos cortes aleatórios, sempre apoiando sobre a mesa a superfície de corte anterior. A partir do terceiro corte já se dispõe de superfícies de corte aleatórias e uniformemente isotrópicas, premissa para a realização da estereologia. Quinze campos microscópicos por animal foram analisados usando vídeo-microscopia. Um sistema teste de 36 pontos (Figura1) foi posto sobre o monitor e calibrado com o uso de micrômetro objeto Leitz 1mm/100. Foram determinados: densidade de número por área (Q_A - número de estruturas na área-teste dividido pela área-teste) de cardiomiócitos (cmy); densidade de volume (V_v) de cardiomiócitos; área seccional transversa média dos cardiomiócitos (A_{cmy}). Os volumes do coração e do ventrículo esquerdo foram determinados pelo método de deslocamento de líquido de Scherle²⁴ (Figura 2). O número de núcleos de cardiomiócitos foi determinado pelo método do "disector óptico" (Figura 3) onde a densidade numérica (N_v) é determinada pela razão entre as

contagens de núcleos no plano selecionado e o volume do "disector" (calculado como o produto entre a espessura do corte e a área-teste). O número total de núcleos de cardiomiócitos é o resultado do produto entre N_v e o volume do ventrículo esquerdo, determinado previamente pelo método de Scherle²⁵.

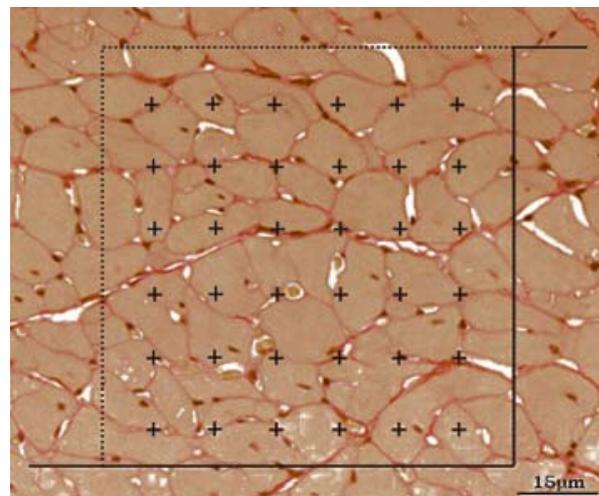


Figura 1

Fotomicrografia do miocárdio com o sistema-teste P36 sobreposto

Com esta metodologia se pode contar pontos-teste sobre os componentes do miocárdio e determinar suas frações de volume (para maiores detalhes ver referência 25).

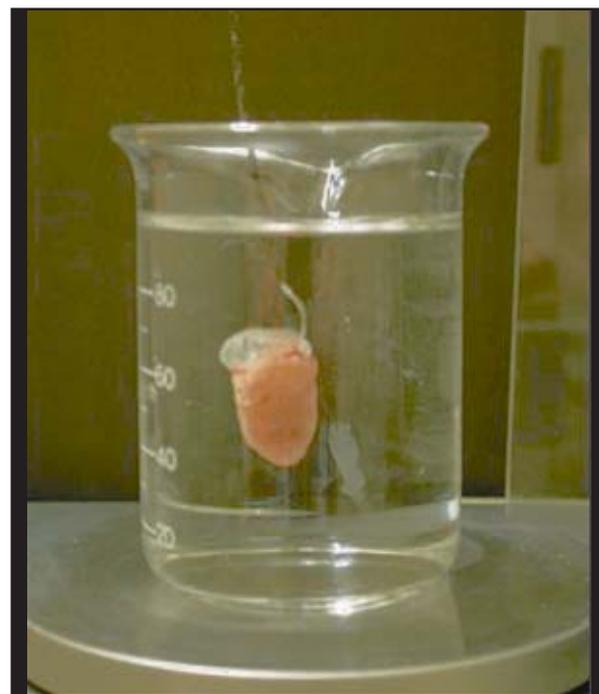


Figura 2

Método de Scherle para a determinação da massa e do volume do coração

O órgão é colocado no meio de solução fisiológica, sem tocar as paredes do recipiente.

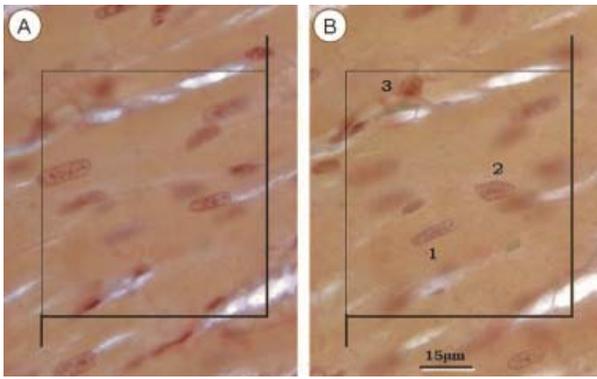


Figura 3

Método do “disector” para a determinação do número de núcleos de cardiomiócitos no ventrículo esquerdo (A) e (B) representam os dois planos do mesmo campo microscópico, separados pela espessura do “disector” (3µm neste caso). Contam-se os núcleos de cardiomiócitos vistos apenas num dos planos (no caso o plano B), sabendo-se que o volume-teste de referência é calculado pelo produto da espessura pela área-teste (aferidas previamente).

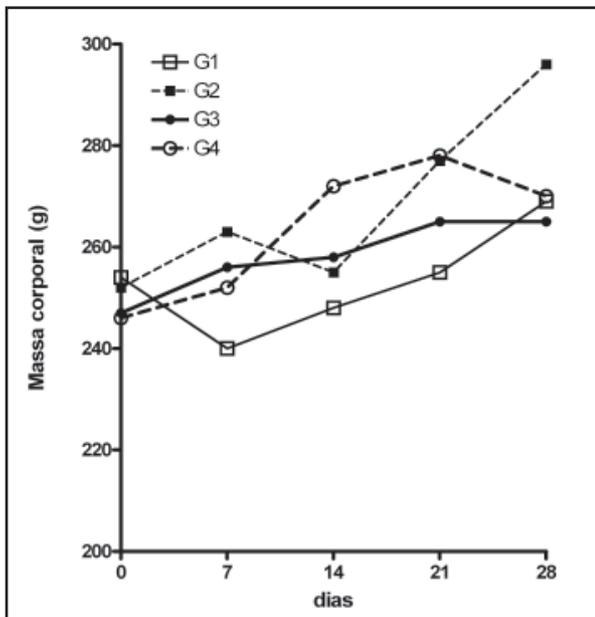


Figura 4

Varição do peso dos animais durante o experimento. Ausência de diferença significativa dos pesos dos animais no final do experimento ($p > 0,05$).

Resultados

As médias de ingestão diária de ração foram: Grupo 1 =14,4g; Grupo 2 =14,1g; Grupo 3 =14,7g; Grupo 4 =13,2g. A massa corporal dos animais se manteve estável durante o experimento nos quatro grupos (Figura 4). Houve redução da pressão arterial nos quatro grupos, porém dentro da faixa de normalidade para ratos Wistar (Figura 5).

Os níveis de TPP, ATm, ETPP, Acmy e Ncmy dos quatro grupos podem ser observados na Tabela 1.

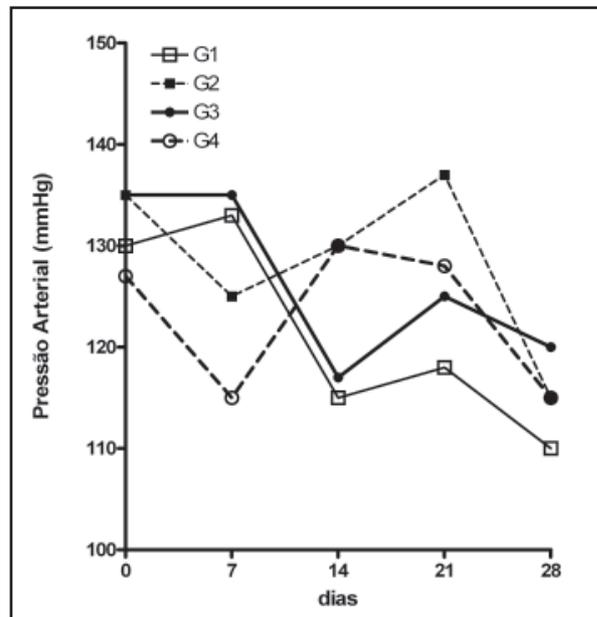


Figura 5

Varição da pressão arterial dos quatro grupos. Redução da pressão arterial dos quatro grupos no final do experimento, porém mantendo-se dentro do limite de normalidade para ratos Wistar e sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$).

Tabela 1

Nível de tiamina e dados estereológicos dos quatro grupos estudados

Grupo	Tiamina	Furosemida	TPP	ATm	ETPP	Acmy	Ncmy
1	+	+	133,7± 17,9	1731±200,0	3,6± 1,9	808± 80	54± 8
2	+	-	160,2± 23,2	1634±137,0	2,2± 1,4	961± 59	63± 2
3	-	+	73,5± 8,6	715±123,0	39,8± 9,8	963± 92	59± 4
4	-	-	82,1± 9,9	863± 75,0	26,2± 11,9	1061± 33	63± 5

Média±desvio-padrão; TPP (tiamina pirofosfato)-ng/100µl de homogeneizado de tecido; ATm (atividade da transcetolase miocárdica)-µg.hexose/ml/h; ETPP (efeito da tiamina pirofosfato sobre a atividade da transcetolase miocárdica)-%; Acmy (área seccional transversa do cardiomiócito)-µm²; Ncmy (número de núcleos de cardiomiócitos)-milhão. Ausência de diferença significativa entre todos os parâmetros avaliados, quando comparados Grupo 1 versus 2 e Grupo 3 versus 4 ($p > 0,05$).

Discussão

Este estudo foi realizado para verificar se ratos adultos submetidos ao uso diário de furosemida desenvolvem deficiência miocárdica de tiamina e alterações estruturais miocárdicas secundárias a esta deficiência. Foi usado o nível de TPP, a atividade da transcetolase do miocárdio e o efeito da TPP na recuperação da transcetolase para relacionar possíveis alterações estruturais com alterações bioquímicas.

Os resultados indicam que em ratos adultos a falta de tiamina na alimentação leva a uma redução significativa na TPP e na atividade da transcetolase do miocárdio; mesmo a adição de TPP às amostras não foi suficiente para a recuperação da atividade normal, o que sugere redução da apoenzima. A furosemida, administrada por 21 dias, não promoveu alteração significativa no nível de tiamina, na atividade da transcetolase, ou na esteologia do miocárdio dos animais.

As conseqüências da deficiência de tiamina para o cardiomiócito foram, mais uma vez, bem determinadas recentemente²⁶, ressaltando-se o início de degeneração celular a partir do 10º dia de ausência da vitamina no meio de cultura, com intensa degeneração entre o 14º e 16º dias, alterações seguidas de redução dos níveis de ATP. O autor descreve também o bloqueio da entrada da tiamina em cardiomiócitos em cultura, em meio de cultura sem tiamina e com furosemida²⁷. O estudo de Ali¹⁷, por sua vez, definiu a dose de 30mg/kg de peso de furosemida como capaz de induzir redução dos níveis sanguíneos de tiamina, quando administrada por 21 dias em ratos Sprague-Dawley em fase de crescimento (peso inicial 120g a 150g). Estes estudos fundamentaram a escolha da dose de furosemida e o tempo de uso da mesma para o presente experimento. Por outro lado, o prolongamento do estudo por mais de três semanas resultaria em importante perda de peso dos animais privados de tiamina, devido à importância desta vitamina para a preservação do apetite^{10,28}, o que comprometeria a interpretação de possíveis alterações estruturais observadas nos grupos estudados.

O estudo de Yui⁸ também envolveu animais em fase de crescimento, ocasião em que há maior demanda de tiamina, o que, associado ao uso do diurético, pode ter contribuído para a observação de níveis significativamente menores de tiamina nesses animais. No entanto, muito embora tenha observado menor atividade de transcetolase e maior ETPP no coração dos grupos que usaram furosemida, só os animais alimentados sem tiamina tiveram valores

de ETPP indicativos de deficiência de tiamina no coração ($\geq 16\%$), após 30 dias de uso do medicamento. O mesmo pode ser observado no estudo de Ali¹⁷, no qual os grupos que receberam furosemida nas doses de 20mg/kg e 30mg/kg de peso tiveram valores de atividade de transcetolase eritrocitária significativamente menores que os do grupo-controle, e valores de ETPP significativamente maiores, porém só os animais que receberam 30mg/kg tiveram ETPP caracterizando deficiência de tiamina, porém com valor limítrofe ($16,2 \pm 1,7\%$). Ressalte-se, mais uma vez, que este último experimento teve duração de 21 dias e também envolveu animais em crescimento. Estas observações motivaram este grupo a estudar animais fora de fase acelerada de crescimento e por período que não compromettesse o seu apetite e, conseqüentemente, gerasse perda de peso significativa. Os resultados encontrados mostram que nessas condições não há redução dos níveis miocárdicos de tiamina pela furosemida.

O uso de métodos estereológicos permite a quantificação das alterações estruturais em cortes histológicos, assim como a obtenção de dados tridimensionais (volumes) a partir da informação bidimensional das lâminas²⁵. Estas importantes ferramentas foram utilizadas em busca de possíveis alterações estruturais associadas ao uso da furosemida, informação que não está descrita até a presente data. Não foram observadas alterações estereológicas significativas nos animais estudados. Os achados do presente estudo corroboram os de Mall²⁸, que não observou alterações estereológicas miocárdicas em ratos privados de tiamina por 35 dias. Neste estudo, não foi necessária a existência de um grupo pareado pelo peso, uma vez que não houve perda significativa de peso dos animais. Ao contrário deste último autor, não foram utilizados animais em fase de crescimento acelerado, o que diminui a interferência do processo natural de hipertrofia do cardiomiócito desta fase na interpretação dos dados estereológicos.

Conclusão

Conclui-se que o uso de furosemida em ratos adultos por 21 dias não reduz os níveis de tiamina ou promove alterações estereológicas no miocárdio dos animais. Ao contrário dos achados deste estudo, trabalhos anteriores publicaram resultados em que se observaram efeitos da furosemida. Isto talvez possa ser explicado pelo fato deles terem utilizado animais em crescimento, com demanda alta por tiamina, enquanto os animais aqui utilizados eram adultos.

Referências

1. Shils ME, Sihe M, Ross AC. Modern nutrition in health and disease. 9thed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999.
2. Gubler C. Thiamin. In: Machlin LJ (ed). Handbook of vitamins: nutritional, biochemical and clinical aspects. New York: Marcel Dekker; 1984:213-25.
3. Tanphaichitr V, Wood B. Thiamin. In: Olson RE, Broquist HP, Chichester CO (eds). Present knowledge in nutrition. 5thed. Washington DC; Nutrition Foundation; 1984:273-84.
4. Leevy WC, Soine LA, Huth MM, et al. Thiamine deficiency in congestive heart failure. *Am J Med.* 1992;93(6):705-706.
5. Chaithiraphan S, Tanphaichitr T, Cheng TO. Nutritional heart disease. In: Cheng T (ed). The International Textbook of Cardiology. New York: Pergamon; 1986:864-70.
6. Tanphaichitr V, Vimokesant SL, Dhanamitta S, Valyasevi A. Clinical and biochemical studies of adult beriberi. *Am J Clin Nutr.* 1970;23(8):1017-1026.
7. Brady JA, Rock CL, Horneffer MR. Thiamin status, diuretic medications, and the management of congestive heart failure. *J Am Diet Assoc.* 1995;95(5):541-44.
8. Yui Y, Itokaua Y, Kawai C. Furosemide-induced thiamine deficiency. *Cardiovasc Res.* 1980;14(9):537-40.
9. Yui Y, Fujiwara H, Mitsui H. Furosemide-induced thiamine deficiency. *Jpn Circ J.* 1978;4:744.
10. Greenblatt DJ, Duhme DW, Allen MD, et al. Clinical toxicity of furosemide in hospitalized patients. A report from the Boston Collaborative Drug Surveillance Program. *Am Heart J.* 1977;94(1):6-13.
11. Hoyumpa Jr AM. Characterization of normal intestinal thiamin transport in animals and man. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;378:337-43.
12. Friedrich W. Thiamine, vitamin B1, aneurin. In: Friedrich W (ed). Vitamins. New York: Walter de Gruyter; 1988:338-41.
13. Dyckner T, Ek B, Nyhlin H, et al. Aggravation of thiamine deficiency by magnesium depletion. A case report. *Acta Med Scand.* 1985;218(1):129-31.
14. Zieve L, Doizaki WM, Stenroos LE. Effect of magnesium deficiency on blood and liver transketolase activity and on the recovery of enzyme activity in thiamine-deficient rats receiving thiamine. *J Lab Clin Med.* 1968;72(2):268-77.
15. Lubetsky A, Winaver J, Seligmann H, et al. Urinary thiamine excretion in the rat: effects of furosemide, other diuretics, and volume load. *J Lab Clin Med.* 1999;134(3):232-37.
16. Rieck J, Halkin H, Almog S, et al. Urinary loss of thiamine is increased by low doses of furosemide in healthy volunteers. *J Lab Clin Med.* 1999;134(3):238-43.
17. Ali BH, Al-Qarawi AA. Thiamin status in furosemide-treated rats. *Pharmacol Res.* 2000;42(1):21-24.
18. Cunha S, Albanesi Filho FM, Cunha Bastos VL, et al. Thiamin, selenium, and copper levels in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy taking diuretics. *Arq Bras Cardiol.* 2002;79(5):454-65.
19. Hanninen SA, Darling PB, Sole MJ, et al. The prevalence of thiamin deficiency in hospitalized patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(2):354-61.
20. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr.* 1993;123(11):1939-51.
21. Brin M. Transketolase (sedoheptulose-7-phosphate: d-glyceraldehyde-3-phosphate dihydroxyacetonetransferase, EC 2.2.1.1.) and the TPP effect in assessing thiamine adequacy. In: McCormic DB, Wright LD (ed). Methods in enzymology, vitamins, and coenzymes. New York: Academic Press; 1970:125-33.
22. Tanphaichitr V. Thiamin. In: Shils ME, Olson JA, Sihe M, Ross AC (eds). Modern nutrition in health and disease. 9thed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1999:381-89.
23. Gundersen HJ, Bendtsen TF, Korbo L, et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *Apmis.* 1988;96(5):379-94.
24. Scherle W. A simple method for volumetry of organs in quantitative stereology. *Mikroskopie.* 1970;26(1):57-60.
25. Mandarim-de-Lacerda C. Stereological tools in biomedical research. *Ann Brazilian Acad Sci.* 2003;75(4):469-86.
26. Zangen A, Shainberg A. Thiamine deficiency in cardiac cells in culture. *Biochem Pharmacol.* 1997;54(5):575-82.
27. Zangen A, Botzer D, Zangen R, et al. Furosemide and digoxin inhibit thiamine uptake in cardiac cells. *Eur J Pharmacol.* 1998;361(1):151-55.
28. Mall G, Mattfeldt T, Mobius HJ, et al. Stereological study on the rat heart in chronic alimentary thiamine deficiency—absence of myocardial changes despite starvation. *J Mol Cell Cardiol.* 1986;18(6):635-43.