

TRABAJOS ORIGINALES

ORIGINALS WORKS

Efecto del ácido alfa lipoico sobre el daño oxidativo inducido por cadmio en corazón, cerebro, riñón, hígado y pulmón de ratas

Effect of Alpha lipoic acid on cadmium induced oxidative damage on heart, Brain, kidney, liver and lung of rats

PRABHU R, UPAGANLAWAR A, BALARAMAN R*

Pharmacy Department, Faculty of Technology and Engineering,
The Maharaja Sayajirao University of Baroda-390 001, Gujarat, INDIA.
Dirección de correo electrónico: rbalaraman2000@yahoo.co.in

RESUMEN

En el presente estudio se investigó el efecto protector del ácido alfa lipoico (ALA) sobre el daño oxidativo inducido por el cadmio en ratas. El cadmio (100 ppm) suministrado a ratas normales dio lugar a un aumento significativo de los niveles de transaminasa glutámico-oxalacética sérica (SGOT), transaminasa glutámico-pirúvica sérica (SGPT) y fosfatasa alcalina (ALP). En los animales expuestos al cadmio se observó igualmente un aumento significativo del nivel de peroxidación lipídica (LPO) y una disminución de los niveles de glutatión reducido (GSH), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y ATPasas de la membrana (Na^+K^+ -ATPasa, Ca^{2+} -ATPasa y Mg^{2+} -ATPasa) en cerebro, pulmón, riñón, hígado y corazón en comparación con el grupo de control. La administración conjunta de ALA (25mg/kg/día, i.p.) y cadmio durante treinta días dio lugar a una disminución significativa de los niveles de SGOT, SGPT y fosfatasa alcalina en suero hasta niveles cercanos a los normales. El uso de ALA también supuso una reducción del nivel de MDA y un aumento de los niveles de SOD, CAT, GSH y ATPasas unidas a la membrana en todos los órganos de los animales tratados con cadmio hasta niveles cercanos a los normales. El presente estudio demuestra el daño inducido por radicales libres derivados de la administración de cadmio sobre distintos órganos y el efecto antioxidante del ALA que protege a los órganos frente a este daño cuando se administra conjuntamente con cadmio.

PALABRAS CLAVE: Ácido alfa lipoico. Antioxidante. Cadmio. Peroxidación lipídica.

ABSTRACT

This study investigated the protective effect of alpha lipoic acid (ALA) on cadmium induced oxidative damage in rats. Cadmium (100ppm) fed to normal rats resulted in significant increase in the level of serum glutamate oxaloacetate transaminase (SGOT), serum glutamate pyruvate transaminase (SGPT) and Alkaline Phosphatase (ALP). Animals exposed to cadmium also showed a significant increase in level of lipid peroxidation (LPO) and decreased levels of reduced glutathione (GSH), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and membrane bound ATPases (Na^+K^+ ATPase, Ca^{2+} ATPase and Mg^{2+} ATPase) in brain, lung, kidney, liver and heart as compared to control group. Co administration of ALA (25mg/kg/day, i.p.) along with cadmium for thirty days significantly decreased the levels of SGOT, SGPT and Alkaline Phosphatase in the serum to near normal levels. ALA also reduced the level of MDA and increased the levels of SOD, CAT, GSH and membrane bound ATPases in all the organs of the animals treated with cadmium to near normal levels. This study demonstrates the free radical damage caused by administration of cadmium on different organs and the antioxidant effect of ALA which protects the organs from this damage when it is given along with cadmium.

KEYWORDS: Alpha lipoic acid. Antioxidant. Cadmium. Lipid peroxidation.

Fecha de recepción: 25-06-2008

Fecha aceptación: 30-01-2009

INTRODUCCIÓN

El cadmio es un producto industrial de interés por su efecto medioambiental que se utiliza en numerosos procesos industriales^{1,2}. Entre las principales vías de exposición al cadmio se encuentran el agua de consumo humano, el aire, los alimentos^{3,4} y productos de origen vegetal⁵, lo que constituye, por tanto, un posible riesgo medioambiental.

El cadmio, a diferencia de otros muchos elementos, se acumula con la edad en los tejidos⁶ como en el riñón, el hígado y otros órganos y se considera más tóxico que el plomo o el mercurio. Los riñones (principalmente la corteza renal) y el hígado son los órganos que se consideran más susceptibles en caso de exposición al cadmio^{7,8}. Mientras que al nacer, la presencia de cadmio en los riñones es muy baja, en adultos⁹ las cantidades presentes en los riñones de este elemento son relativamente altas, lo que parece indicar una exposición ambiental.

La exposición al cadmio da lugar a episodios de la enfermedad de itai itai, edemas pulmonares¹⁰, hipertensión¹¹, disfunción tubular renal adquirida o congénita¹². El cadmio disminuye el glutatión, grupos tioles unidos a proteínas resultantes de la producción de especies reactivas del oxígeno como radicales hidroxilos, peróxido de hidrógeno e ión superóxido. Como consecuencia, se producen daños en el ADN y un aumento de la peroxidación lipídica (LPO)¹³.

El ácido alfa lipoico (ALA), también denominado "ácido tióctico", fue descubierto en 1951 como una molécula que colabora en la transferencia del grupo acilo y como una coenzima en el ciclo de Krebs. ALA es un cofactor natural en complejos dehidrogenasa como piruvato dehidrogenasa y alfa cetoglutarato dehidrogenasa. ALA es un potente antioxidante tanto en medios solubles en agua como grasos y su actividad antioxidante se extiende tanto a su forma reducida como oxidada. Los investigadores han encontrado igualmente que ALA aumenta el glutatión intracelular¹⁴, los niveles de la coenzima Q10 y que regenera la vitamina C a partir de su forma oxidada, el ácido dehidroascórbico.

No se ha estudiado el efecto de ALA sobre los cambios inducidos por el cadmio en LPO, antioxidantes y enzimas de la membrana como consecuencia del estrés oxidativo. Por esta razón, se ha intentado determinar el efecto de ALA en los niveles de LPO, antioxidantes y enzimas

INTRODUCTION

Cadmium is an industrial product which is of environmental concern and used in many industrial processes^{1,2}. The primary sources responsible for cadmium exposure include drinking water, air, food^{3,4} and products of vegetable origin⁵, thus providing a possible environmental hazard.

Cadmium, in contrast to many other elements, accumulates with age in tissues⁶ as in the kidney, liver and various other organs and is considered more toxic than either lead or mercury. Kidneys (mainly renal cortex) and liver are considered to be the most susceptible organs in the case of exposure to cadmium^{7,8}. Very little renal cadmium is present at birth, but relatively large amounts of this element are present in the kidneys of adults⁹ which is suggestive of environmental exposure.

Exposure to cadmium leads to itai-itai disease episode, pulmonary edema¹⁰, hypertension¹¹, congenital or acquired renal tubular dysfunction¹². Cadmium depletes glutathione, protein-bound sulfhydryl groups resulting in the production of reactive oxygen species such as superoxide ion, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals. As a consequence, enhanced lipid peroxidation (LPO) and DNA damage occurs¹³.

Alpha-lipoic acid (ALA) also known as "thioctic acid" was discovered in 1951 as a molecule that assists in acyl-group transfer and as a coenzyme in the Krebs cycle. ALA is a natural cofactor in dehydrogenase complexes such as pyruvate dehydrogenase and alpha-ketoglutarate dehydrogenase. ALA is a potent antioxidant in both fat and water-soluble mediums and its antioxidant activity extends to both its oxidized and reduced forms. Researchers have also found ALA increases intracellular glutathione¹⁴, coenzyme Q10 levels¹⁵ and also regenerate vitamin C from its oxidized form, dehydroascorbic acid.

The effect of ALA on the cadmium induced changes on LPO, antioxidants and membrane bound enzymes which is a consequence of oxidative stress have not been explored. Therefore an attempt has been made to carry out the effect of ALA on the levels of LPO, antioxidants and tissue membrane bound enzymes in vital organs like liver, kidney, heart, lung and brain of rats exposed to Cadmium.

de la membrana tisular de órganos vitales como hígado, riñones, corazón, pulmones y cerebro de ratas expuestas al cadmio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuentes de fármacos y productos químicos: El ácido alfa lipoico fue proporcionado como muestra gratuita por Alembic Pharma Ltd., Vadodara, (India). El cloruro de cadmio se obtuvo de S. D. Fine Chemicals, Mumbai, (India). Superóxido dismutasa, estándares de referencia de catalasa, glutatión reducido y 1, 1, 3, 3 tetraetoxipropano se adquirieron en Sigma Chemicals, St Louis, (EE.UU.). El resto de reactivos y productos químicos utilizados en el estudio eran de grado analítico.

Animales

Se mantuvieron ratas albinas adultas (variedad Wistar) de ambos sexos de entre 200 y 250 g de peso a $23\pm 2^\circ\text{C}$ en un animalario bien ventilado bajo condiciones de fotoperiodo naturales en jaulas grandes de polipropileno. Los animales fueron alimentados con una dieta de pienso estándar y agua *ad libitum*. Todos los experimentos y protocolos descritos fueron aprobados por el Comité de Ética Animal Institucional (IAEC, Institutional Animal Ethics Committee) de la M. S. University, Baroda, India.

Procedimiento experimental

Se disolvió el cloruro de cadmio en agua doblemente desionizada y se suministró *ad libitum*.

Los animales se dividieron en cuatro grupos compuestos por seis animales cada uno.

El Grupo I sirvió como grupo de control y recibió agua doblemente desionizada y una alimentación normal durante el periodo experimental

El Grupo II recibió 100 ppm de cloruro de cadmio en agua doblemente desionizada durante 30 días

El Grupo III recibió ácido alfa lipoico (25 mg/kg/día, i. p) y agua doblemente desionizada

El Grupo IV recibió ácido alfa lipoico (25 mg/kg/día, i. p) y 100 ppm de cloruro de cadmio en agua doblemente desionizada

MATERIALS AND METHODS

Sources of drugs and chemicals: Alpha Lipoic acid was received as a gift sample from Alembic Pharma Ltd., Vadodara, (India). Cadmium chloride was obtained from S. D. Fine Chemicals, Mumbai, (India). Superoxide dismutase, Catalase reference standards, reduced glutathione and 1, 1, 3, 3-tetraethoxy propane were obtained commercially from Sigma Chemicals, St Louis, (USA). All other reagents and chemicals used in the entire study were of analytical grade.

Animals

Adult albino rats (Wistar strain) of either sex weighing 200-250g were maintained at $23\pm 2^\circ\text{C}$ in a well ventilated animal house under natural photoperiod conditions in large polypropylene cages. The animals were fed with standard pellet diet and water *ad libitum*. All experiments and protocols described were approved by the Institutional Animal Ethics Committee (IAEC) of M. S. University, Baroda, India.

Experimental procedure

Cadmium chloride was dissolved in double deionized water and given *ad libitum*

The animals were divided into four groups with six animals in each group

Group I served as control group and received double deionized Water (DDW) and normal food throughout the experimental period

Group II received 100ppm Cadmium Chloride in DDW for a period of 30days

Group III received alpha lipoic acid (25 mg/kg/day, i. p) and DDW

Group IV received alpha lipoic acid (25 mg/kg/day, i. p) and cadmium chloride 100ppm in DDW

Biochemical Parameters

Estimation of serum marker enzymes

At the end of thirty days, all the animals were anaesthetized with ether and blood was collected by retro orbital plexus without any

Parámetros bioquímicos

Estimación de enzimas marcadoras del suero

Transcurridos treinta días, se anestesió a todos los animales con éter y se tomó una muestra de sangre a través del plexo retroorbital sin ningún anticoagulante y se dejó coagular durante 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se centrifugó a 2500 rpm durante 20 minutos. El suero obtenido se mantuvo a 4° C hasta su uso posterior. Los niveles de fosfatasa alcalina (ALP) en suero se determinaron mediante kits de estándares de Reckon Diagnostic Ltd, India, mientras que los niveles de transaminasa glutámico-oxalacética (SGOT) y transaminasa glutámico-pirúvica (SGPT) se determinaron mediante el kit de estándares de Span Diagnostic Pvt Ltd, India.

Estimación de biomarcadores de estrés oxidativo

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se procedió a la extirpación del hígado, riñón, corazón, pulmón y cerebro en frío mediante placas de Petri previamente enfriadas. A continuación, se secaron los restos de sangre y fluidos tisulares. Los órganos se pesaron y se cortaron con un escalpelo quirúrgico en finas láminas, se enfriaron en sacarosa de 0,25 M enfriada en hielo y, a continuación, se secaron en papel de filtro. Los tejidos se picaron y homogeneizaron en 10 mM de tampón Tris-HCl (pH 7,4) a una concentración de 10% p/v mediante 25 golpes de homogeneizador con junta de teflón a una velocidad de 2500 rpm. La homogeneización prolongada en condiciones hipotónicas provocó la ruptura de la estructura ventricular de las células con el fin de liberar proteínas solubles y dejar la membrana y la materia no vascular en forma de sedimento. Los homogenados se centrifugaron a 10.000 X g a 4 °C durante 20 minutos mediante centrifugación con refrigeración de alta velocidad (Remi C-24). El sobrenadante limpio se utilizó para la estimación de los siguientes parámetros

*Estimación de peroxidación lipídica*¹⁶

Se agregó 2,0 ml de homogenado tisular (sobrenadante) a 2,0 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% p/v recién preparado. La mezcla

anticoagulante y se permitió coagular por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2500 rpm por 20 minutos. El suero obtenido se mantuvo a 4°C hasta su uso posterior. Los niveles de Fosfatasa Alcalina (ALP) se determinaron utilizando kits estándar de Reckon Diagnostic Ltd, India, mientras que los niveles de transaminasa glutámico-oxaloacética (SGOT) y transaminasa glutámico-piruvato (SGPT) se estimaron utilizando el kit estándar de Span Diagnostic Pvt Ltd, India.

Estimación de biomarcadores de estrés oxidativo

Los animales se sacrificaron mediante dislocación cervical y se procedió a la extirpación del hígado, riñón, corazón, pulmón y cerebro en frío mediante placas de Petri previamente enfriadas. A continuación, se secaron los restos de sangre y fluidos tisulares. Los órganos se pesaron y se cortaron con un escalpelo quirúrgico en finas láminas, se enfriaron en sacarosa de 0,25 M enfriada en hielo y, a continuación, se secaron en papel de filtro. Los tejidos se picaron y homogeneizaron en 10 mM de tampón Tris-HCl (pH 7,4) a una concentración de 10% w/v mediante 25 golpes de homogeneizador con junta de teflón a una velocidad de 2500 rpm. La homogeneización prolongada en condiciones hipotónicas provocó la ruptura de la estructura ventricular de las células con el fin de liberar proteínas solubles y dejar la membrana y la materia no vascular en forma de sedimento. Los homogenados se centrifugaron a 10.000 X g a 4 °C durante 20 minutos mediante centrifugación con refrigeración de alta velocidad (Remi C-24). El sobrenadante limpio se utilizó para la estimación de los siguientes parámetros

*Estimación de lipídica peroxidación*¹⁶

2.0 ml de la homogenada tisular (sobrenadante) se agregó a 2.0 ml de ácido tricloroacético (TCA) recién preparado al 10% w/v. La mezcla se permitió coagular por 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2500 rpm por 20 minutos. El suero obtenido se mantuvo a 4°C hasta su uso posterior. Los niveles de Fosfatasa Alcalina (ALP) se determinaron utilizando kits estándar de Reckon Diagnostic Ltd, India, mientras que los niveles de transaminasa glutámico-oxaloacética (SGOT) y transaminasa glutámico-piruvato (SGPT) se estimaron utilizando el kit estándar de Span Diagnostic Pvt Ltd, India.

se mantuvo en un baño de hielo durante 15 minutos. Transcurridos 15 minutos, el precipitado se separó mediante centrifugación y se mezcló 2,0 ml de sobrenadante limpio con 2,0 ml de ácido tiobarbitúrico (TBA) recién preparado. La disolución resultante se calentó al baño María durante 10 minutos. Inmediatamente después se enfrió en un baño de hielo durante 5 minutos. El color desarrollado se midió a 532 nm frente a la muestra sin reactivos (blanco). Los valores se expresaron como nM de MDA/g de tejido.

Estimación de superóxido dismutasa¹⁷

Se diluyeron 0,5 ml de homogenado tisular con 0,5 ml de agua destilada, a lo que se agregó 0,25 ml de etanol enfriado en hielo y 0,15 ml de cloroformo enfriado en hielo. El resultado se mezcló bien con un mezclador ciclónico durante 5 minutos y se centrifugó a 2500 rpm. Se agregó a 0,5 ml de sobrenadante, 1,5 ml de tampón carbonato y 0,5 ml de disolución de ácido etilendiaminotetracético (EDTA). La reacción se inició mediante la adición de 0,4 ml de epinefrina y se midió el cambio de densidad óptica/minuto a 480 nm frente a la muestra sin reactivos (blanco). La actividad de SOD se expresó como unidades/g de tejido.

Estimación de catalasa¹⁸

Se agregó a 2 ml de muestra diluida, 1 ml de peróxido de hidrógeno (30 mmol/l) para iniciar la reacción. Para la preparación del blanco se mezclaron 2 ml de muestra diluida (dilución similar) con 1 ml de tampón fosfato (50 mmol/l; pH 7,0). La dilución debe permitir que la absorbancia inicial sea aproximadamente de 0,500. La disminución de absorbancia se midió a 240 nm. La actividad de catalasa se expresó como μmoles de H_2O_2 consumido/min/g de tejido.

Estimación de glutatión reducido¹⁹.

Se mezclaron volúmenes iguales de homogenado tisular (sobrenadante) y TCA al 20%. La fracción precipitada se centrifugó y se agregó a 0,25 ml de sobrenadante, 2 ml de reactivo DTNB. Se agregó tampón fosfato hasta alcanzar un volumen final de 3 ml. El color desarrollado se midió a 412 nm frente a la muestra sin reactivos (blanco). Se preparó una curva estándar utilizando

Estimation of superoxide dismutase¹⁷

0.5ml of tissue homogenate was diluted with 0.5ml of distilled water, to which 0.25ml of ice-cold ethanol and 0.15ml of ice-cold chloroform was added. The mixture was mixed well using cyclone mixer for 5 minutes and centrifuged at 2500 rpm. To 0.5ml of supernatant, 1.5ml of carbonate buffer and 0.5ml of EDTA solution were added. The reaction was initiated by the addition of 0.4ml of epinephrine and the change in optical density/minute was measured at 480nm against reagent blank. SOD activity was expressed as units/g tissue.

Estimation of catalase¹⁸

To 2ml of diluted sample 1ml of hydrogen peroxide (30 mmol/l) was added to initiate the reaction. The blank was prepared by mixing 2ml of diluted sample (similar dilution) with 1ml of phosphate buffer (50mmol/l; pH 7.0). The dilution should be such that the initial absorbance should be approximately 0.500. The decrease in absorbance was measured at 240nm. Catalase activity was expressed as μmoles of H_2O_2 consumed/min/g tissue.

Estimation of reduced glutathione¹⁹.

Equal volumes of tissue homogenate (supernatant) and 20% TCA were mixed. The precipitated fraction was centrifuged and to 0.25ml of supernatant, 2ml of DTNB reagent was added. The final volume was made up to 3ml with phosphate buffer. The colour developed was read at 412nm against reagent blank. Different concentrations (10-50 μg) of standard glutathione were taken and processed as above for standard graph. The amount of reduced glutathione was expressed as μg of GSH/g of tissue.

Estimation of membrane bound enzymes

The sediment after centrifugation of tissue homogenate was resuspended in ice-cold Tris buffer (10 mM, pH 7.4) to get a final concentration of 10%w/v and was used for the estimation of different membrane bound enzymes such as $\text{Na}^+\text{K}^+\text{ATPase}^{20}$, $\text{Ca}^{2+}\text{ATPase}^{21}$ and $\text{Mg}^{2+}\text{ATPase}^{22}$.

Statistical analysis: Results of all the above estimations have been indicated in terms of mean

diferentes concentraciones (10-50µg) del glutatión estándar. La cantidad de glutatión reducido se expresó como µg de GSH/g de tejido.

Estimación de enzimas de la membrana

El sedimento obtenido tras la centrifugación del homogenado tisular se suspendió de nuevo en tampón Tris enfriado en hielo (10 mM, pH 7,4) para obtener una concentración final del 10% p/v y se utilizó para la estimación de distintas enzimas de la membrana como Na⁺K⁺-ATPasa²⁰, Ca²⁺-ATPasa²¹ y Mg²⁺-ATPasa²².

Análisis estadístico: Los resultados de todas las estimaciones anteriores se han indicado en términos de media ± E.S.M (error estándar de la media). La diferencia entre los grupos se determinó estadísticamente mediante el análisis de la varianza (ANOVA) seguido por la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Los resultados se consideraron significativos desde el punto de vista estadístico cuando p<0,05.

RESULTADOS

Efecto de ALA sobre el peso corporal

En la Tabla 1 se muestra el cambio de peso corporal al final del periodo de tratamiento en comparación con el grupo de control. El tratamiento con cloruro de cadmio provoca una disminución significativa del peso corporal en comparación con el grupo de control, mientras que el tratamiento con ALA supone un aumento del peso corporal en comparación con el grupo tratado con cadmio.

TABLE 1. Efecto de ALA sobre el peso corporal de animales tratados con cadmio.
TABLE 1. Effect of ALA on body weight of the animals treated with cadmium.

| Grupos <i>Groups</i> | Control <i>Control</i> | Cadmio <i>Cadmium</i> | Ácido alfa lipoico <i>Alpha-Lipoic acid</i> | Cadmio+Ácido alfa lipoico <i>Cadmium+Alpha-Lipoic acid</i> |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|--|---|
| Peso inicial <i>Initial weight</i> | 224,2±1,49 | 225,0±1,61 | 225,6±1,03 | 223,2±1,85 |
| Peso final <i>Final weight</i> | 236,0±0,70 | 192,8±2,52*** | 237,8±1,74 | 225,2±1,46^^^ |

Los valores se han expresado como media ± ESM (n=6) para cada observación.*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 en comparación con el grupo de control. ^p<0,05, ^^p<0,01, ^^p<0,001 en comparación con el grupo tratado con cadmio.

Values expressed as mean ± SEM (n=6) for each observation.*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to control group. ^p<0.05, ^^p<0.01, ^^p<0.001 compared to cadmium treated group.

± S.E.M. Difference between the groups was statistically determined by analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's Multiple Comparison test. Results were considered statistically significant when p<0.05.

RESULTS

Effect of ALA on body weight

Table 1 showed the change in body weight at the end of treatment period as compared to control. Treatment with Cadmium chloride leads to significant reduction in body weight as compared to control group whereas treatment with ALA improves the body weight compared to cadmium treated group.

Efecto de ALA sobre los parámetros del suero

Effect of ALA on serum parameters

No se registró ningún caso de mortalidad en los grupos expuestos exclusivamente al cadmio o al ácido alfa lipoico, ni en el expuesto a ambas sustancias durante el periodo de tratamiento de 30 días.

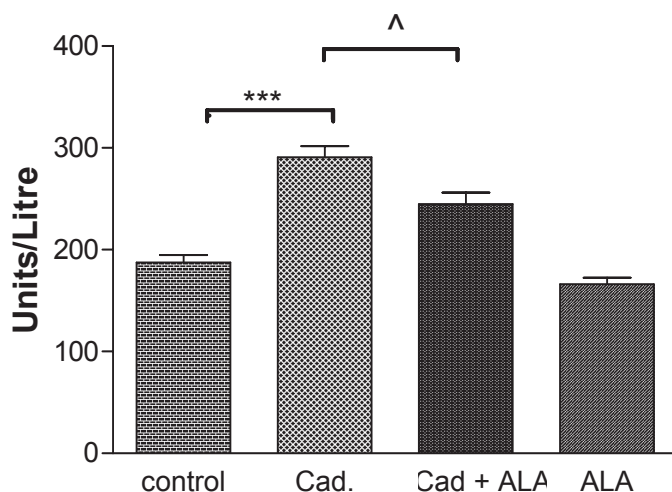
La administración de cloruro de cadmio a las ratas dio como resultado un aumento significativo de los niveles de SGOT ($p < 0,001$), SGPT ($p < 0,001$) y ALP ($p < 0,001$) en suero en comparación con el grupo de control. El tratamiento conjunto con ácido alfa lipoico y cloruro de cadmio durante 30 días supuso una disminución significativa de los niveles de SGOT ($p < 0,05$), SGPT ($p < 0,001$) y ALP ($p < 0,001$) en comparación con los grupos tratados con cadmio (Fig. 1, 2 y 3).

No mortality was observed in animals of any group exposed to cadmium or Alpha Lipoic acid alone or in combination during the treatment period of 30 days.

Administration of cadmium chloride to the rats showed a significant increase in the level of serum SGOT ($p < 0.001$), SGPT ($p < 0.001$) and ALP ($p < 0.001$) as compared to control group. Treatment with alpha lipoic acid along with cadmium chloride for 30 days significantly decreased the levels of SGOT ($p < 0.05$), SGPT ($p < 0.001$) and ALP ($p < 0.001$) compared to cadmium treated groups (Fig.1, 2 & 3).

FIGURA 1. Efecto de ALA sobre el nivel de SGOT en suero en ratas tratadas con cadmio.

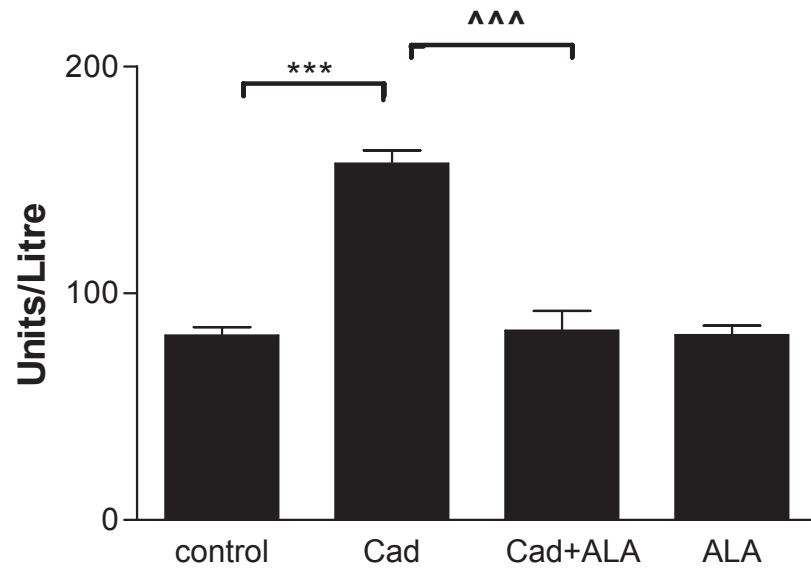
FIGURE 1. Effect of ALA on serum SGOT level in cadmium treated rats.



Los valores se han expresado como media \pm ESM (n=6) para cada observación. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo de control. ^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$, ^^ $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado con cadmio.

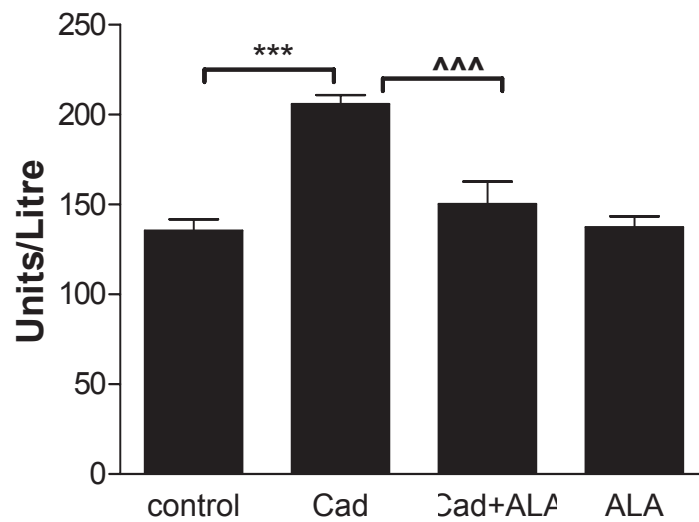
Values expressed as mean \pm SEM (n=6) for each observation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control group. ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ compared to cadmium treated group.

FIGURA 2. Efecto de ALA sobre el nivel de SGPT en suero en ratas tratadas con cadmio.
FIGURE 2. Effect of ALA on serum SGPT level in cadmium treated rats



Los valores se han expresado como media \pm ESM (n=6) para cada observación. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo de control. ^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$, ^^ $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado con cadmio.
 Values expressed as mean \pm SEM (n=6) for each observation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control group. ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ compared to cadmium treated group.

FIGURA 3. Efecto de ALA sobre el nivel de ALP en suero en ratas tratadas con cadmio.
FIGURE 3. Effect of ALA on serum ALP level in cadmium treated rats.



Los valores se han expresado como media \pm ESM (n=6) para cada observación. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ en comparación con el grupo de control. ^ $p < 0,05$, ^^ $p < 0,01$, ^^ $p < 0,001$ en comparación con el grupo tratado con cadmio.
 Values expressed as mean \pm SEM (n=6) for each observation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to control group. ^ $p < 0.05$, ^^ $p < 0.01$, ^^ $p < 0.001$ compared to cadmium treated group.

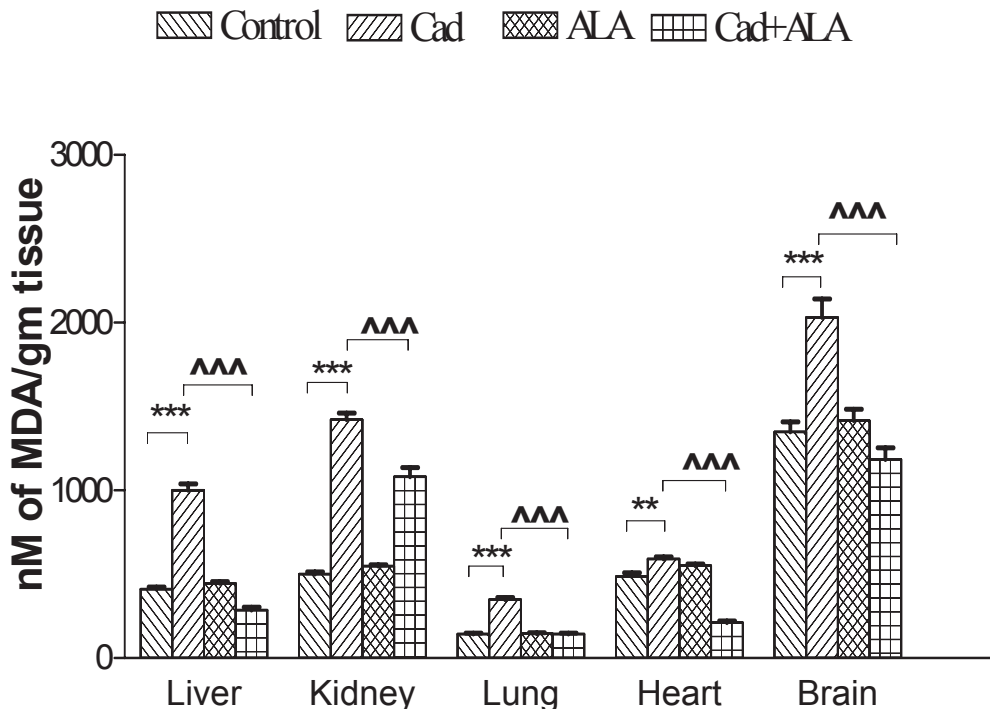
Efecto de ALA sobre los niveles de antioxidantes endógenos y LPO

Los animales expuestos al cadmio mostraron un aumento significativo del nivel de LPO (Fig. 4) y una disminución de los niveles de GSH, SOD y CAT en cerebro, hígado, pulmón, riñón y corazón en comparación con el grupo de control. La administración conjunta de ácido alfa lipoico (25 mg/kg /día, i. p) y cadmio provocó una disminución significativa del nivel de MDA en cerebro, hígado, pulmón, riñón y corazón en comparación con el grupo tratado con cadmio. El tratamiento con ALA y cadmio durante 30 días provoca un aumento significativo del nivel de SOD y CAT en todos los órganos, a excepción de que no se registró un aumento significativo de la actividad de CAT en el pulmón, mientras que el nivel de GSH en el corazón aumentó significativamente volviendo a valores prácticamente normales en comparación con el hígado, pulmón, riñón y cerebro (Tabla 2).

Effect of ALA on LPO and endogenous antioxidant levels

Animals exposed to cadmium showed a significant increase in level of LPO (Fig 4) and decreased levels of GSH, SOD and CAT in brain, liver, lung, kidney and heart as compared to control group. Co- administration of Alpha Lipoic acid (25 mg/kg /day, i. p) with cadmium significantly decreased the level of MDA in brain, liver, lung, kidney and heart as compared to cadmium treated group. Treatment with ALA for 30 days along with cadmium leads to significant increase in the level of SOD and CAT in all the organs, except there was no significant increase in the CAT activity in the lung whereas in the GSH level the heart showed a significant increase coming back to almost normal value compared to liver, lung, kidney and brain (Table 2).

FIGURA 4. Efecto de ALA sobre el nivel de peroxidación lipídica en ratas tratadas con cadmio.
FIGURE 4. Effect of ALA on lipid peroxidation level in cadmium treated rats.



Los valores se han expresado como media \pm ESM (n=6) para cada observación. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 en comparación con el grupo de control. ^p<0,05, ^^p<0,01, ^^p<0,001 en comparación con el grupo tratado con cadmio.
 Values expressed as mean \pm SEM (n=6) for each observation. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 compared to control group. ^p<0.05, ^^p<0.01, ^^p<0.001 compared to cadmium treated group.

TABLA 2. Efecto de la exposición al cadmio solo y en combinación con ALA sobre los niveles de antioxidantes endógenos en los órganos de ratas.

TABLE 2. Effect of cadmium exposure alone and in combination with ALA on the levels of endogenous antioxidants in the organs of Rats.

| Grupos Groups | Cerebro Brain | Corazón Heart | Hígado Liver | Riñón Kidney | Pulmón Lung |
|---|------------------|------------------|-----------------|-----------------|---------------------------|
| Superóxido dismutasa (U/g de tejido) Superoxide dismutase (U/g of tissue) | | | | | |
| Control Control | 345,8±5,589 | 306,0±5,030 | 200,2±3,200 | 221,8±6,974 | 172,4±4,354 |
| Cadmio (100 ppm) Cadmium (100ppm) | 84,40±4,155*** | 92,80±1,934*** | 73,20±1,594*** | 82,40±2,293*** | 85,60±1,568*** |
| ALA (25 mg/kg, i.p) ALA (25mg/kg,i.p) | 345,0±3,945 | 320,4±3,429 | 237,2±9,568 | 241,0±8,837 | 181,6±5,354 |
| ALA + Cadmio ALA + Cadmium | 350,0±5,791^^ | 296,0±3,564^^ | 198,0±4,974^^ | 215,0±5,079^^ | 169,6±3,544^^ |
| Catalasa (µmoles de H₂O₂ consumido/min/g de tejido) Catalase (µmoles of H₂O₂ Consumed/min/g of tissue) | | | | | |
| Control Control | 76,10±1,438 | 114,2±1,459 | 44,86±1,141 | 47,06±1,242 | 207,4±4,925 |
| Cadmio (100 ppm) Cadmium (100ppm) | 3,68±0,355*** | 38,46±0,9234*** | 16,68±0,6888*** | 28,90±0,661** | 109,2±2,728*** |
| ALA (25 mg/kg, i.p) ALA (25mg/kg,i.p) | 77,68±0,8071 | 125,4±2,293 | 46,36±0,7089 | 53,02±1,328 | 235,2±3,891 |
| ALA + Cadmio ALA + Cadmium | 56,16±0,9811^^ | 65,30±1,153^^ | 44,80±0,9301^^ | 46,71±1,508^^ | 120,0±2,429 ^{ns} |
| GSH (mcg/g de tejido) GSH (mcg/g of tissue) | | | | | |
| Control Control | 21,58±1,025 | 7,060±0,1208 | 30,50±0,5450 | 33,62±0,7207 | 25,42±0,9578 |
| Cadmio (100 ppm) Cadmium(100ppm) | 12,66±0,6153** | 4,200±0,1732*** | 16,14±0,3957*** | 24,12±1,152** | 10,58±0,4005*** |
| ALA (25 mg/kg, i.p) ALA(25mg/kg,i.p) | 22,52±0,3707 | 7,320±0,2596 | 32,82±0,2458 | 34,20±0,2408 | 24,80±0,2775 |
| ALA + Cadmio ALA + Cadmium | 20,44±0,2926^^ | 7,100±0,0908^^ | 27,72±0,7003^^ | 38,02±0,6583^^ | 23,94±0,6683^^ |

Los valores se han expresado como media ± ESM (n=6) para cada observación. *p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001 en comparación con el grupo de control, ^p<0,05, ^^ p<0,01, ^^p<0,001,^{ns} p>0,05 en comparación con el grupo tratado con cadmio

Values expressed as mean ± SEM (n=6) for each observation. *p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001 compared to Control group, ^p<0.05, ^^ p<0.01, ^^p<0.001,^{ns} p>0.05 compared to cadmium treated group

Efecto de ALA sobre las ATPasas de la membrana

El nivel de las enzimas Na⁺K⁺-ATPasa, Ca²⁺-ATPasa y Mg²⁺-ATPasa de la membrana disminuyó significativamente en hígado, corazón, cerebro, riñón y pulmón en el caso de los animales tratados con cadmio en comparación con el grupo de control. El tratamiento con ALA de los animales expuestos al cadmio provocó un aumento significativo de los niveles de Na⁺-K⁺-ATPasa en corazón, hígado, riñón y cerebro en comparación con los animales expuestos al cadmio, con la excepción

Effect of ALA on membrane bound ATPases

The membrane bound Na⁺K⁺ATPase, Ca²⁺ATPase and Mg²⁺ATPase decreased significantly in Liver, Heart, Brain, Kidney and Lung in the animals treated with cadmium as compared to control group. ALA treatment to the cadmium exposed animals showed a significant increase in the levels of Na⁺-K⁺ATPase in Heart, Liver, Kidney, Brain compared to the animals exposed to cadmium except in Lung. There was a significant increase in Ca²⁺ATPase and Mg²⁺ATPase levels in ALA treated groups as compared to control

del pulmón. Se observó un aumento significativo de los niveles de Ca²⁺-ATPasa y Mg²⁺-ATPasa en los grupos tratados con ALA en comparación con el grupo de control, a excepción del nivel de Mg²⁺-ATPasa en el riñón (Tabla 3).

group except in the level of Mg²⁺-ATPase in the Kidney (Table 3).

TABLA 3. Efecto de la exposición al cadmio solo y en combinación con ALA sobre los niveles de las ATPasas de la membrana en los órganos de ratas.

TABLE 3. Effect of cadmium exposure alone and in combination with ALA on the levels of membrane bound ATPases in the organs of Rats.

| Grupos Groups | Cerebro Brain | Corazón Heart | Hígado Liver | Riñón Kidney | Pulmón Lung |
|--|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Na⁺-K⁺-ATPasa Na⁺-K⁺-ATPase | | | | | |
| Control Control | 8,380±0,1463 | 7,920±0,1281 | 8,000±0,2236 | 11,01±0,1102 | 10,94±0,2135 |
| Cadmio (100 ppm) Cadmium(100ppm) | 4,260±0,2064*** | 5,480±0,1855** | 4,450±0,1924*** | 7,760±0,1720*** | 7,980±0,1241*** |
| ALA (25 mg/kg, i.p) ALA(25mg/kg,i.p) | 8,600±0,1385 | 7,960±0,1286 | 8,120±0,2093 | 11,32±0,1146 | 10,72±0,1956 |
| Cd+ALA Cd+ALA | 12,02±0,2478 ^{^^^} | 9,520±0,2200 ^{^^} | 10,65±0,1183 ^{^^^} | 12,28±0,2009 ^{^^^} | 9,680±0,1715 ^{ns} |
| Ca⁺⁺-ATPasa Ca⁺⁺-ATPase | | | | | |
| Control Control | 22,46±0,3789 | 22,06±0,1720 | 22,36±0,2977 | 24,88±0,5054 | 23,96±0,4142 |
| Cadmio (100 ppm) Cadmium(100ppm) | 18,34±0,2482** | 19,62±0,3089* | 15,78±0,2478*** | 17,46±0,2542*** | 19,79±0,3588** |
| ALA (25 mg/kg, i.p) ALA(25mg/kg,i.p) | 21,28±0,2083 | 22,00±0,2510 | 21,80±0,2470 | 24,04±0,2015 | 23,96±0,1435 |
| Cd+ALA Cd+ALA | 22,22±0,3353 ^{^^} | 28,12±0,1463 ^{^^^} | 22,48±0,2746 ^{^^^} | 28,94±0,4285 ^{^^^} | 26,96±0,3894 ^{^^^} |
| Mg⁺⁺-ATPasa Mg⁺⁺-ATPase | | | | | |
| Control Control | 23,18±0,3747 | 21,80±0,2881 | 21,96±0,3458 | 26,82±0,2800 | 19,87±0,3780 |
| Cadmio (100 ppm) Cadmium(100ppm) | 18,84±0,2891** | 18,24±0,2337** | 18,14±0,2502** | 23,30±0,2828** | 14,87±0,2267*** |
| ALA (25 mg/kg, i.p) ALA(25mg/kg,i.p) | 22,98±0,2835 | 21,72±0,1828 | 21,86±0,2064 | 23,78±0,1881 | 26,70±0,2214 |
| Cd+ALA Cd+ALA | 26,48±0,2990 ^{^^^} | 24,02±0,4104 ^{^^^} | 24,30±0,2828 ^{^^^} | 24,78±0,3247 ^{ns} | 22,54±0,2750 ^{^^^} |

(Unidades de ATPasa – expresadas como mM de Pi liberado/g de tejido) Los valores se han expresado como media ± ESM (n=6) para cada observación.

*p<0,05, ** p<0,01, ***p<0,001, ^{ns}p>0,05 en comparación con el grupo de control, ^p<0,05, ^^ p<0,01, ^^p<0,001, ^{ns} p>0,05 en comparación con el grupo tratado con cadmio

(Units for ATPase- expressed as mM of Pi liberated/g tissue) Values expressed as mean ± SEM (n=6) for each observation.

*p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001, ^{ns}p>0.05 compared to Control group, ^p<0.05, ^^ p<0.01, ^^p<0.001, ^{ns} p>0.05 compared to cadmium treated group

DISCUSIÓN

Los estudios realizados *in vitro* y con animales sugieren que el ácido lipoico puede ser un complemento beneficioso en el tratamiento de una toxicidad por metales pesados y, en concreto, de una toxicidad por cadmio²³.

Los animales tratados con cadmio durante 30 días mostraron una disminución significativa del peso corporal, posiblemente como consecuencia de una menor ingesta de alimentos, lo que es indicativo de una toxicidad por cadmio. El tratamiento con ALA mejora la pérdida de peso corporal en comparación con las ratas tratadas con cadmio. Los radicales libres participan en los procesos fisiológicos normales de los organismos vivos. Actúan como mensajeros en la transducción de señales y afectan también a la expresión genética²⁴. Existen diversas proteínas y biomoléculas en los organismos vivos que actúan como secuestradores de radicales libres. Además de estas biomoléculas, existen varios suplementos dietéticos que contienen vitaminas, polifenoles y flavonas que juegan un papel significativo en esta materia²⁵. En el presente experimento, la toxicidad inducida por cadmio se manifiesta por el aumento de los niveles de SGOT, SGPT y ALP en suero, lo que puede deberse al daño sufrido en las membranas de distintos órganos. La liberación de estas enzimas de la membrana dañada es muy elevada y aparece rápidamente en el suero²⁶. Los niveles elevados de fosfatasa alcalina en suero indican cambios degenerativos en los órganos, especialmente en el hígado²⁷. ALA mejora los niveles elevados de fosfatasa alcalina restaurando los niveles de las enzimas de la membrana, lípidos y corrigiendo las modificaciones citosólicas.

En el presente estudio, se observó que la exposición al cadmio inducía a la peroxidación lipídica en los órganos de las ratas. La peroxidación lipídica es un proceso mediado por radicales libres destructivo para las membranas biológicas y que ha sido implicado en diversas enfermedades. El cadmio induce peroxidación lipídica y este proceso implica la formación y propagación de radicales lipídicos, el consumo de oxígeno, una reorganización del doble enlace en los lípidos insaturados, lo que da origen a una variedad de productos degradados como alquenos, malondialdehído, hidroperóxido lipídico y dieno conjugado, y finalmente la destrucción de los

DISCUSSION

In-vitro and animal studies suggest Lipoic acid supplementation might be a beneficial component in the treatment of heavy metal toxicity particularly toxicity involving cadmium²³.

Animal treated with cadmium for 30days showed significant decrease in body weight which may be because of decrease in food intake, which indicates the toxicity by cadmium. Treatment with ALA improves the loss in body weight compared to cadmium treated rats. Free radicals are involved in normal physiological processes in the living organisms. They act as the messenger for signal transduction and also affect gene expression²⁴. There are several proteins and biomolecules in the living organism, which act as free radical scavengers. Besides these biomolecules, several diet supplements containing vitamins, polyphenols, and flavones also play a significant role in this matter²⁵. In the present experiment cadmium induced toxicity is manifested by increased serum levels of SGOT, SGPT and ALP which may be due to the damage of the membranes of various organs. The leakage of these enzymes from the damaged membrane is very high and appears rapidly in the serum²⁶. The elevated levels of alkaline phosphatase in serum indicate some degenerative changes in the organs especially in liver²⁷. ALA ameliorates the augmented levels of alkaline phosphatase by restoring the levels of membrane bound enzymes, lipids and correcting the cytosolic disturbances.

In the present study, it was observed that exposure to cadmium induced lipid peroxidation in the organs of rats. Lipid peroxidation is a destructive free radical mediated process for biological membranes, which has been implicated in a variety of disease states. Cadmium induces lipid peroxidation and this process involves formation and propagation of lipid radicals, the uptake of oxygen, a re-arrangement of the double bond in unsaturated lipids that results in the variety of degraded products like alkenes, malondialdehyde, lipid hydroperoxide and conjugated diene and eventually destruction of membrane lipids. Reduced glutathione is a protective molecule against chemical induced cytotoxicity²⁸ and plays a vital role in many biological processes, in detoxification of xenobiotics, hydrogen peroxide and various free radicals and toxic substances²⁹. It has been reported that the GSH levels decreases rapidly

lípidos de la membrana. El glutatión reducido es una molécula que protege frente a la citotoxicidad inducida por productos químicos²⁸ y que juega un papel vital en numerosos procesos biológicos, en la desintoxicación de xenobióticos, peróxido de hidrógeno y diversos radicales libres y sustancias tóxicas²⁹. Se ha establecido en otro estudio que los niveles de GSH disminuyen rápidamente en animales expuestos al cadmio³⁰. En el presente estudio se han observado resultados similares. El superóxido dismutasa constituye una defensa efectiva de la célula frente a la generación endógena y exógena de radical superóxido³¹. En el presente estudio, los niveles de superóxido dismutasa en los distintos órganos disminuyeron significativamente en el caso de animales expuestos al cadmio, lo que puede atribuirse a la liberación de radicales superóxido en los órganos. Se ha establecido en otro estudio que la catalasa es responsable de la desintoxicación de peróxido de hidrógeno³². La catalasa puede actuar protegiendo a las células frente al ataque de ingentes cantidades de peróxido de hidrógeno. Los organismos con niveles deficitarios de catalasa son destruidos con mayor rapidez por el peróxido de hidrógeno³³. En el presente estudio, los niveles de catalasa en los distintos órganos disminuyeron significativamente en el caso de los animales expuestos al cadmio. Esto indica la formación de mayores cantidades de peróxido de hidrógeno en los órganos.

Es bien conocido que ALA es un antioxidante que protege a las células frente al ataque de los radicales libres. En el presente estudio, se ha observado que ALA tiene un efecto beneficioso sobre el nivel de GSH, SOD y CAT y la peroxidación lipídica inducida por cadmio. La actividad secuestradora de radicales libres del ácido alfa lipoico puede deberse tanto a su forma oxidada (ALA) como a su forma reducida, ácido dihidrolipoico (DHHLA). El ácido alfa lipoico puede secuestrar oxígeno y DHHLA puede secuestrar especies reactivas de oxígeno, peróxido y superóxido³⁴. DHHLA es capaz de regenerar directamente ácido ascórbico a partir de ácido dehidroascórbico e indirectamente vitamina E³⁵.

En el presente estudio, la disminución de los niveles de Na⁺K⁺-ATPasa, Ca²⁺-ATPasa y Mg²⁺-ATPasa pudo deberse a un aumento de la peroxidación lipídica causada por radicales libres, dado que estas enzimas de la membrana son enzimas que contienen el grupo 'SH', que son dependientes

in animals exposed to cadmium³⁰. Similar results were observed in the present study. Superoxide dismutase is an effective defense of the cell against endogenous and exogenous generation of superoxide radical³¹. In the present study, the superoxide dismutase levels in the different organs were decreased significantly in animals exposed to cadmium. This may be attributed to the release of superoxide radical in the organs. Catalase has been reported to be responsible for detoxification of hydrogen peroxide³². Catalase may function to protect the cells against onslaught of horrendous amounts of hydrogen peroxide. Catalase deficient organisms are more rapidly killed by hydrogen peroxide³³. In the present study, the catalase levels in the different organs were decreased significantly in the animals exposed to cadmium. This indicates formation of higher amounts of hydrogen peroxide in the organs.

It is well known that ALA is an antioxidant that protects the cells from free radical attack. In present study, ALA has shown the beneficial effect on the cadmium induced lipid peroxidation, GSH, SOD and CAT level. The free radical scavenging activity of Alpha lipoic acid may be due to its both oxidized (ALA) and reduced form, dihydrolipoic acid (DHHLA). Alpha lipoic acid may scavenge oxygen and DHHLA may scavenge superoxide and peroxy reactive oxygen species³⁴. DHHLA is capable of directly regenerating ascorbic acid from dehydroascorbic acid and indirectly regenerating vitamin E³⁵.

In the present study the decrease in the levels Na⁺K⁺ATPase, Ca²⁺ATPase and Mg²⁺ATPase could be due to enhanced lipid peroxidation by free radicals, since these membrane bound enzymes are 'SH' group containing enzymes, which are lipid dependant³⁶. ALA shows free radical scavenging activity and regularizes the lipid levels thereby preventing inactivation of 'SH' group and stabilizing the membrane bound enzymes³⁷. Thus it was evidenced in the study supplementation of ALA to the animals exposed to cadmium corrected the levels of ATPases by correcting the disturbed lipid levels. In conclusion the present study confirmed the cadmium induced toxicity along with involvement of oxidative stress. Co administration of ALA may be beneficial for preventing cadmium toxicity in rats.

de lípidos³⁶. ALA muestra actividad secuestradora de radicales libres y regula los niveles de lípidos, evitando así la desactivación del grupo 'SH' y estabilizando las enzimas de la membrana³⁷. En este estudio se ha demostrado, por tanto, que la administración de ALA a animales expuestos al cadmio corrige los niveles de ATPasas corrigiendo los niveles de lípidos alterados. En conclusión, el presente estudio confirma la toxicidad inducida por cadmio con implicación de estrés oxidativo. La administración conjunta de ALA puede ser beneficiosa para evitar la toxicidad por cadmio en ratas.

BIBLIOGRAFÍA/ BIBLIOGRAPHY

1. Fulkerson W and Goeller HE .Cadmium: The Dissipated Element. Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, Tenn., 1973.
2. Friberg L. Cadmium in the Environment.2nd ed.CRC Press, Cleveland, 1974.
3. Bryce-Smith S and Stephens R. Exposure to lead. Lancet, 1981;307: 877.
4. Friberg L, Nordberg GF and Vouk VB. Handbook on the toxicology of metals,1979 : 451-500. Elsevier Biomed Press, New York.
5. Klos A. Lead, cadmium and mercury content in meals planned for consumption in selected kindergartens in Warsaw. IV International Scientific & -Technical Conference, Warsaw 2001:4-5X.
6. Perry HM, Jr, et al. Variation in the concentration of cadmium in human kidney as a function of age and geographic origin. J. Chronic Dis, 1961: 14: 259.
7. Ryan PB, Huet N, MacIntosh DL. Longitudinal investigation of exposure to arsenic, cadmium and lead in drinking water. Environ Health Perspect, 2000. 108:731-5.
8. Yiin SJ, Chern CL, Sheu JY, Tseng WC, Lin TH. Cadmium induced renal lipid peroxidation in rats and protection by selenium Toxicol Environ Health A.; 1999.57:403-13.
9. Schroeder HA and Balassa JJ. Abnormal trace metals in man: cadmium. J. Chronic Dis.1961.14:236.
10. Friberg L, Piscator M and Nordberg. Cadmium in the environment.CRC Press, Cleveland, Ohio.1971.
11. Balaraman, R. Some Pharmacological Investigations of Cadmium.Ph.D. Thesis, M.S.University of Baroda.1986.
12. Butler EA and Flynn FV. The proteinuria of renal tubular disorders.Lancet, 1958: 2: 978.
13. Stohs SJ, Bagchi D. Oxidative mechanisms in toxicity of metal ions. Free Radic. Biol. Med, 1995: 18(2): 321-336.
14. Busse E, Zimmer G, Schopohl B, Kornhuber B. Influence of alpha-lipoic acid on intracellular glutathione in vitro and in vivo.Arzneimittelforschung 1992;42:829-831.
15. Kagan V, Serbinova E, Packer L.Antioxidant effects of ubiquinones in microsomes and mitochondria are mediated by tocopherol recycling. Biochem Biophys. Res. Commun. 1990; 169:851-857.
16. Slater TF and Sawyer BC. The stimulatory effect of carbon tetrachloride and other halogenoalkanes on peroxidative reactions in rat liver fractions in vitro. Biochem. J, 1971:123:805-814.
17. Misra HP and Firidovich I. The role of superoxide anion in the auto oxidation of epinephrine and simple assay of superoxide dismutase.J.Biol.chem, 1972:247: 3170-3175.
18. Sinha AK. Colorimetric assay of catalase.Anal.Biochem,1972: 47:389-394.
19. Moran MS, Depirre JW and Mannaervik B. Levels of glutathione, glutathione reductase and glutathione-s-transferase activity in rat lung and liver. Biochem. Biophys. Acta, 1979: 582: 67-78.
20. Bonting SL. Presence of enzyme system in mammalian tissue.In: Bilter, E.E.editor, Membrane and ion transport, 1970: 257-263.Wiley Inter Science, London.
21. Hjerken S and Pan H. Purification and characterization of two forms of low affinity calcium ion ATPase from erythrocyte membranes. Biochem. Biophys. Acta, 1983: 728: 281-288.
22. Ohinishi T, Suzuki T, Suzuki, Y and Ozawa KAA. Comparative study of plasma membrane magnesium ion ATPase activities in normal regenerating and malignant cells.Biochem.Biophys.Acta,1982: 684:67-74.
23. Muller L. Protective effects of DL-Lipoic acid on cadmium-induced deterioration of rat hepatocytes.Toxicology 1989; 58:175-185.
24. Armario A, Compmany L, Borrás M and Hidalgo J, Vitamin E supplemented diet reduce lipid peroxidation but do not alter either pituitary-adrenal, glucose and lactate responses to immobilization stress or gastric ulceration, Free Radic Res Commun,1990: 9(2):113.
25. Sherman M, Antioxidant decade, Pharmacy times, 2000: 66(2):69.

26. Pappas, Jr. Source of increased aspartate and alanine amino transferase cyclohexidine effect on CCL₄ hepatotoxicity. *Clinica. Chemica. Acta*, 1986;154:181-190.
27. Othman AI, Misery EL, MA. Role of selenium against lead toxicity in male rats. *J.Biochem.Mol.Toxicol*,1998; 12(6): 345-349.
28. Orrenius S and Moldeus P. The multiple role of glutathione in drug metabolism. *Trends Pharmac Sci*,1984: 5:432.
29. Meister, A. New aspects of glutathione biochemistry and transport-selective alteration of glutathione metabolism. *Nutr. Rev*,1984: 42:397.
30. Karmarkar R, Banik S, Bandyopadhyay S, Chatterjee M. Cadmium induced alteration of hepatic lipid peroxidation, glutathione levels and their possible correlation with chromosomal aberration in mice: a time course study. *Mutant. Res.*,1998: 397(2):183-190.
31. Brawn K and Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutase: threat and defense. *Acta Physiol Scand Suppl*, 1980: 492: 9-18.
32. Brenner S and Alison AL. Catalase inhibition: A possible mechanism for the production of Heinz bodies in erythrocytes. *Experimentia*,1953. 9: 381.
33. Mam Eation, J.W. (1990). Is Catalase really important? *Free radi.Biol.Med.* 9,132.
34. Ayaz SA, Bhandari U, Pillai KK, Influence of DL a-lipoic acid and vitamin-E against doxorubicin-induced biochemical and histological changes in the cardiac tissue of rats. *Ind J Pharmacol*.2005;37:294-299.
35. Scholich H, Murphy ME, Sies H. Antioxidant activity of dihydrolipoate against microsomal lipid peroxidation and its dependence on alpha-tocopherol. *Biochem Biophys Acta*1989;1001:256-261.
36. Gubdjorson S, Hallgrimson J, Skuldottir G. Properties of transport adenosine triphosphatase. In: Peter, H., Gresham, G.A., Paoetti, R. *Arterial Pollution*. New York. Plenum Publishing Corp.1983:101.
37. Tanaka R and Strickland KP. Role of Phospholipid in the activation of Na⁺-K⁺-ATPase adenosine triphosphatase in beef brain. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1965.111, 583-592.