

Trabajo Científico

Hepatotoxicidad por exposición a plomo y su protección con tiamina y ácido ascórbico

The protective effect of thiamine and ascorbic acid against hepatotoxicity induced by lead exposure

Alcaraz-Contreras Y.,¹ Pérez-Medina A. L.,¹ Cárdenas-Pérez A. G.,¹ Vázquez-Guevara M. A.,²
Durán-Castro E.,¹ Deveze-Álvarez M. A.,¹ Martínez-Alfaro M.,¹ Ramírez-Gómez X. S.³

¹Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato

²Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato

³Departamento de Medicina y Nutrición, División de Ciencias de la Salud, Universidad de Guanajuato

Resumen

En este trabajo se determinó el efecto hepatoprotector de tiamina y ácido ascórbico en ratas intoxicadas por plomo, en un esquema de dosis administradas como terapia individual y combinada. Los parámetros evaluados fueron: 1) marcadores de daño hepático (alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina) y 2) análisis histológico de cortes hepáticos. La administración de antioxidantes produjo disminución de los niveles de las enzimas evaluadas. A nivel histológico, se observó regeneración en la conformación y arquitectura del tejido hepático con los diferentes esquemas de tratamiento. El análisis bioquímico e histológico indicó que los antioxidantes revierten, en grado variable, el daño que produce el Pb en el hígado.

Abstract

In this study was determined the hepatoprotective effect of thiamine and ascorbic acid in a dose regimen administered as individual therapy and combined in experimental lead intoxication examined in rats. The effect was evaluated on parameters indicative of liver damage: 1) markers of liver damage (alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase) and 2) histopathological changes. Ascorbic acid and thiamine was found to be effective in decreased levels of hepatic enzymes with some treatments. In microscopic examination all treatments improved regeneration of the liver tissue. Biochemical and histological analysis indicated that antioxidants reverse, in varying degrees, the liver damage produced by lead.

Palabras clave: ácido ascórbico, tiamina, plomo, hepatotoxicidad.

Key words: ascorbic acid, thiamine, lead, hepatotoxicity.

Correspondencia

Dra Yolanda Alcaraz Contreras
Departamento de Farmacia, División de Ciencias Naturales y Exactas
Universidad de Guanajuato
Col. Noria Alta S/N,
Guanajuato, Gto. C.P. 36050
Teléfono 473 7320006 Ext. 8123
e-mail: yolaalca@ugto.mx

Fecha de recepción: 19 de septiembre de 2011
Fecha de recepción de modificaciones: 18 de noviembre de 2011
Fecha de aceptación: 16 de diciembre de 2011

Introducción

El plomo (Pb) es un metal tóxico que se encuentra frecuentemente en el ambiente.¹ La exposición a dosis bajas a largo plazo produce su acumulación en el organismo y da lugar a la aparición de toxicidad crónica. Diversos estudios han demostrado la toxicidad del Pb en varios órganos y sistemas entre ellos el tejido hepático.^{2,3} Por otro lado, se ha reportado que la exposición a Pb produce una disminución de la actividad del citocromo P450 modificando de esta manera algunas reacciones metabólicas hepáticas.^{4,5} Otros estudios han evaluado la posible asociación entre la exposición a Pb y el daño hepático mediante la evaluación de la actividad de enzimas como la alanina aminotransferasa (ALT) lactato deshidrogenasa y la fosfatasa alcalina (ALKP) reportando que el incremento de su actividad es dosis-dependiente.^{6,7} A nivel histológico, se ha reportado que el Pb produce cambios en diferentes tejidos celulares,⁸⁻¹¹ Shalan y cols⁸ describieron, a las 2 semanas de exposición a Pb, dilatación y congestión de las venas hepáticas terminales y de las ramas de la vena porta, así como proliferación de hepatocitos sin una localización específica. A las 6 semanas, observaron esteatosis, apoptosis, fibrosis leve y un infiltrado inflamatorio portal con disrupción de las placas limitantes. Massó y cols¹¹ reportaron un incremento en la actividad de las enzimas fosfatasa ácida y alcalina en ratas expuestas a Pb durante la gestación.

Se ha propuesto que el estrés oxidante es uno de los mecanismos más importantes de la toxicidad del Pb,¹² este estado se caracteriza por la producción de un desbalance entre el estado prooxidante-antioxidante. En las últimas décadas el interés por la evaluación del efecto de la administración de antioxidantes en la intoxicación por Pb ha hecho que muchos de estos compuestos hayan sido evaluados.¹³⁻¹⁶ Entre los antioxidantes más estudiados están el ácido ascórbico (vitamina C) y la tiamina. Al respecto, Wang C y cols¹⁷ evaluaron el efecto de la combinación de tiamina y ácido ascórbico en ratones expuestos a Pb encontrando una disminución de daño hepático inducido por estrés oxidante. Otros reportes señalan que la tiamina y ácido ascórbico antagonizaron la toxicidad en tejido testicular de ratones intoxicados por Pb.¹⁸

La mayoría de los estudios realizados a la fecha, en relación al efecto terapéutico de los antioxidantes en la intoxicación por Pb, se han enfocado principalmente a la evaluación del efecto de los mismos sobre parámetros indicativos de estrés oxidante y son pocos los reportes de estudios donde se halla realizado una evaluación sistémica que incluya el efecto que tienen sobre las enzimas indicadoras de daño hepatocelular y su evaluación histológica. Por otro lado, el ácido ascórbico y la tiamina son antioxidantes que han sido evaluados extensamente y se ha

reportado que además disminuyen los niveles de Pb por lo que resulta interesante evaluar el efecto hepatoprotector en un modelo de intoxicación por Pb así como determinar el posible efecto sinérgico de la terapia combinada.

En el presente trabajo se evaluó el efecto del ácido ascórbico y la tiamina administradas como terapia individual y combinada en un modelo de intoxicación por Pb en ratas. Para la evaluación se consideraron parámetros indicadores de daño hepático (ALT, aspartato aminotransferasa (AST), ALKP) y se analizaron los cambios histológicos de cortes hepáticos.

Material y método

Animales

Se utilizó un total de 40 ratas machos y hembras de la cepa Wistar con un peso de 180 ± 20 g, que se dividieron al azar en ocho grupos de cinco animales cada uno. Para su cuidado y manejo se consideraron las especificaciones señaladas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.¹⁹ El grupo I no fue expuesto a Pb (control negativo), los grupos II al VIII recibieron una solución de acetato de Pb al 3% administrado *ad libitum* durante 12 semanas. Terminado el periodo de exposición al Pb las ratas recibieron tiamina y/o ácido ascórbico (sigma®) administrados mediante sonda orogástrica, como terapia individual o combinada durante siete días.

La tiamina se evaluó a dosis de 50 y 100 mg/kg²⁰ y el ácido ascórbico a 100 y 500 mg/kg.¹⁶ El grupo I no recibió ningún tratamiento; el grupo II, expuesto a Pb, recibió agua como tratamiento (control positivo), el grupo III recibió 50 mg/kg de tiamina; el grupo IV recibió 100 mg/kg de tiamina; el grupo V recibió 100 mg/kg de ácido ascórbico; el grupo VI recibió 500 mg/kg de ácido ascórbico; el grupo VII recibió tratamiento combinado de tiamina y ácido ascórbico (50 y 100 mg/kg respectivamente) y el grupo VIII recibió tratamiento combinado de tiamina y ácido ascórbico (100 y 500 mg/kg respectivamente). Después de 24 horas de concluido el tratamiento, los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico vía intraperitoneal y se tomaron muestras de sangre mediante punción intracardiaca. Las muestras de sangre fueron recolectadas en tubos al vacío sin anticoagulante para determinar el valor de los marcadores de daño hepático. Al hígado se le realizó una infusión *in situ* con solución salina fisiológica y se colocó en formol al 10% hasta el procesamiento del órgano para su evaluación histológica.

Determinación de las pruebas de funcionamiento hepático

Las muestras de sangre sin anticoagulante fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 10 min para obtener el suero y en éste se determinaron los marcadores de daño hepático a través de un método espectrofotométrico utilizando el equipo System Vitros Chemistry®.

Preparaciones histológicas

Los cortes histológicos fueron obtenidos después de la inclusión en parafina del tejido hepático, se procesaron y tiñeron con hematoxilina-eosina (H-E) y se observaron bajo microscopía de luz fotónica.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron a través de un diseño completamente al azar. Se realizó un análisis ANOVA y la comparación de medias por el método de Tukey mediante el programa: JMP IN 4. Se consideró un valor de $P < 0.05$ para establecer diferencia significativa.

Resultados

Parámetros bioquímicos

La administración de Pb durante doce semanas produjo un incremento significativo únicamente en los niveles de ALT, los demás parámetros evaluados no mostraron diferencia significativa cuando se compararon con el grupo control negativo (no expuesto a Pb). La administración de ácido ascórbico en su dosis baja y la combinada de ácido ascórbico y tiamina en su dosis alta, disminuyó significativamente el nivel de ALT respecto al control positivo. En la Tabla 1 se muestran los valores de los parámetros de funcionamiento hepático de todos los grupos experimentales.

En relación al valor de AST, encontramos diferencia significativa del grupo que recibió tratamiento combinado de ácido ascórbico y tiamina administrados en su dosis baja con todos los demás grupos incluyendo controles. Por otro lado, en el tratamiento combinado en su dosis alta se observó que existe una diferencia significativa respecto a cada uno de los controles.

Tabla 1. Efecto de tiamina y ácido ascórbico sobre parámetros de funcionamiento hepático en ratas intoxicadas por Pb.

Grupo	ALT (U/L)	AST (U/L)	ALKP (U/L)
I	58.9 ± 7.0	142.3 ± 28.9	118.2 ± 20.0
II	71.5 ± 4.1 ^a	147.8 ± 37.6	149 ± 23.1
III	55 ± 6.3 ^b	150 ± 13.2	85 ± 26.6 ^b
IV	65.4 ± 8.9	112.5 ± 29.1	130.2 ± 48.8
V	63.3 ± 5.0	107 ± 19.3	121.4 ± 56.9
VI	66.2 ± 5.4	108.4 ± 21.2	217.2 ± 43.9 ^{a,c}
VII	52.5 ± 12.2	258 ± 65.0 ^c	97.5 ± 39.6
VIII	40.1 ± 22 ^b	81.8 ± 19.1	183 ± 82.7

Los datos representan los promedios ± la desviación estándar (n = 5). Grupo I, control normal; grupo II, expuesto a Pb; grupo III, Pb + ácido ascórbico 100 mg/kg; grupo IV, Pb + ácido ascórbico 500 mg/kg; grupo V, Pb + tiamina 50 mg/kg; grupo VI, Pb + tiamina 100 mg/kg; grupo VII, Pb + tiamina 50 mg/kg + ácido ascórbico 100 mg/kg; grupo VIII, Pb + tiamina 100 mg/kg + ácido ascórbico 500 mg/kg. ^a $P < 0.05$, comparado con grupo I. ^b $P < 0.05$, comparado con el grupo II. ^c $P < 0.05$, diferencia entre tratamientos.

El nivel de ALKP no mostró variación significativa en el grupo expuesto a Pb respecto al control negativo. La administración de ácido ascórbico en su dosis baja disminuyó significativamente el nivel de ALKP respecto al control positivo y no hubo diferencia con el control negativo. La administración de tiamina en su dosis alta aumentó significativamente el nivel de ALKP respecto al control negativo, el tratamiento de ácido ascórbico en su dosis baja y la combinación de ácido ascórbico y tiamina también en su dosis baja.

Evaluación histológica

El Pb produjo daño histológico caracterizado por deformación de la disposición radial de hepatocitos, disminución de sinusoides, aumento de células de Kupffer, núcleos picnóticos, vacuolas, células binucleadas y presencia de anisonucleosis (Figura 1).

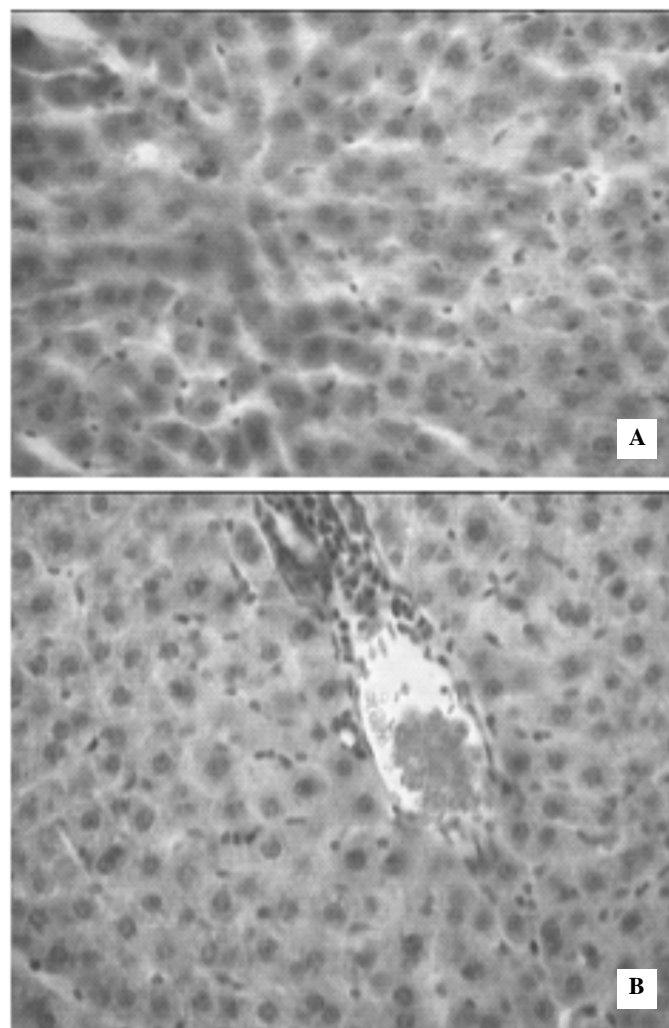


Figura 1. Tejido hepático de ratas expuestas a Pb durante 12 semanas. Tinción H-E, 40 X. (A) Pérdida de la arquitectura de lobulillos. (B) Relación núcleo/citoplasma aumentada. Infiltrado inflamatorio.

Algunas de estas alteraciones fueron revertidas en mayor o menor proporción por las dosis evaluadas de ácido ascórbico y tiamina.

En los cortes hepáticos de ratas expuestas a Pb y tratadas con ácido ascórbico a dosis de 100 mg/kg (Figura 2) se observaron lobulillos de tamaño variable, disminución del número de células de Kupffer por lobulillo, sin recuperación de la pérdida de disposición radial hepatocítica. Sin embargo, los núcleos están bien definidos y se observaron pocas células binucleadas.

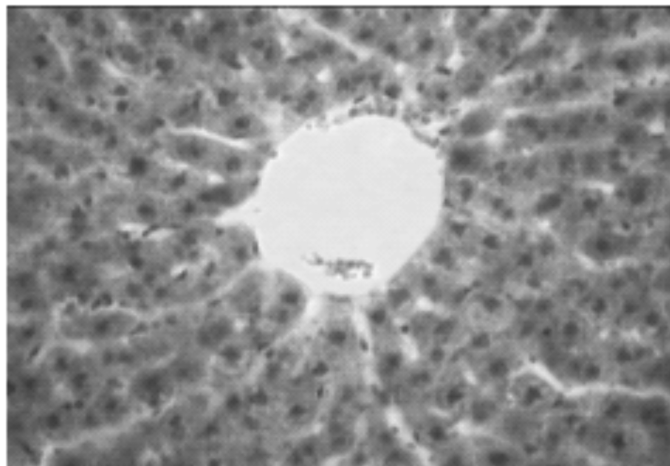


Figura 2. Tejido hepático de ratas expuestas a Pb y tratadas con ácido ascórbico a dosis de 100 mg/kg. Pérdida de la disposición radial hepatocítica. Tinción H-E, 40X.

En los cortes hepáticos de ratas expuestas a Pb y tratadas con ácido ascórbico a dosis de 500 mg/kg (Figura 3) se observó disminución en el tamaño de sinusoides y algunas zonas con vasocongestión, sin embargo hubo mejoría en la disposición radial hepatocítica con disminución del número de células de Kupffer por sinusoides, pocas células binucleadas y no se observó presencia de pycnosis.

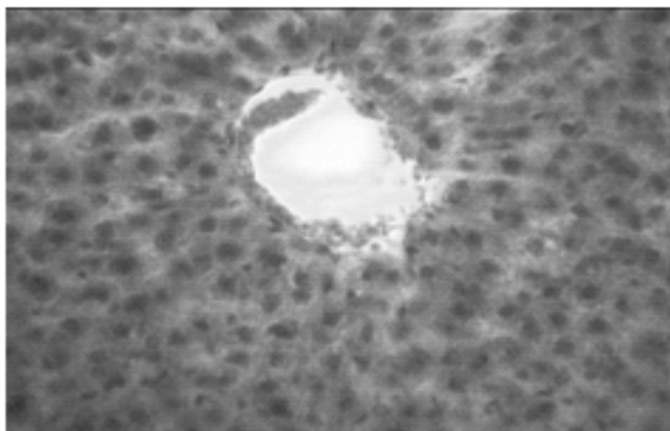


Figura 3. Tejido hepático de ratas expuestas a Pb y tratadas con ácido ascórbico a dosis de 500 mg/kg. Tinción H-E, 40X. Nótese la ausencia de sinusoides.

En los tejidos de las ratas expuestas a Pb y tratadas con tiamina se observó vasocongestión, escasas células binucleadas, relación núcleo/citoplasma alterado (Figura 4 (A)). Con la dosis de 100 mg/kg se observaron mayor número de venas centrales pequeñas en comparación con la dosis de 50 mg/kg (Figura 4 (B)).

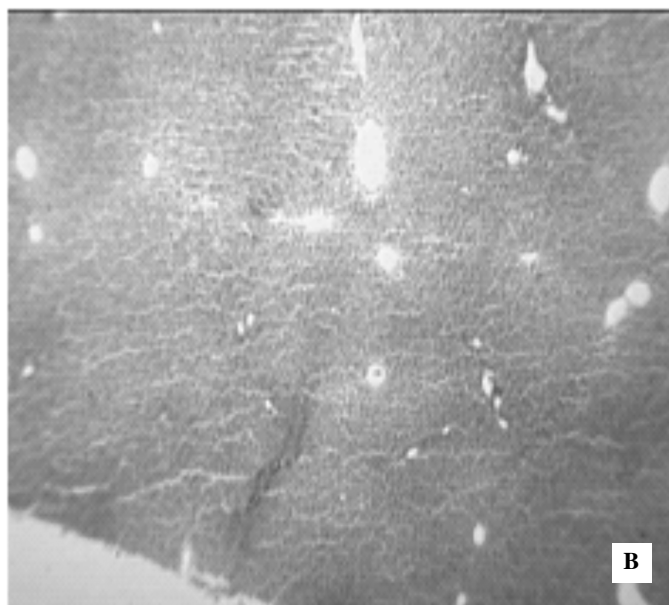
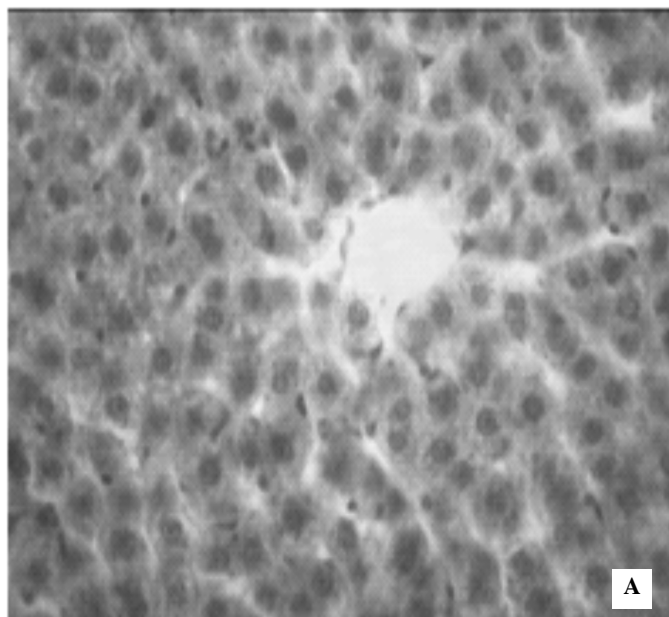


Figura 4. (A) Tejido hepático de ratas expuestas a Pb y tratadas con tiamina 50 mg/kg. Tinción H-E. 40X (B) Tejido hepático de ratas expuestas a Pb y tratadas con tiamina 100 mg/kg. Aumento del número de venas centrales. Tinción H-E, 10X.

El tratamiento combinado de tiamina y ácido ascórbico en su dosis baja produjo mejor disposición radial de hepatocitos, algunos núcleos ligeramente hipercromáticos y con más de un nucléolo. Figura 5(A). Con la administración conjunta de los antioxidantes en su dosis alta se observó menor cantidad de lobulillos, presencia de varios nucléolos y mejoró la disposición radial de hepatocitos. Figura 5(B).

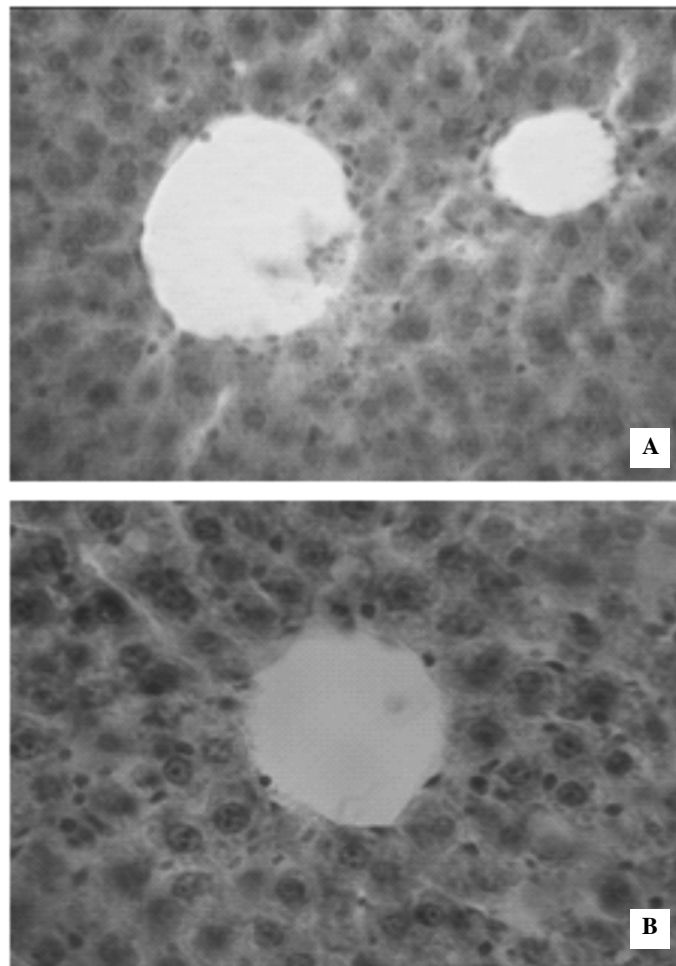


Figura 5. (A) Tejido hepático de ratas expuestas a Pb y tratadas con tiamina y ácido ascórbico a dosis de 50 y 100 mg/kg respectivamente. Algunos núcleos irregulares e hipercromáticos y hepatocitos organizados. (B) Tejido hepático de ratas expuestas a Pb y tratadas con tiamina y ácido ascórbico 100 y 500 mg/kg respectivamente. Hepatocitos organizados y presencia de varios nucléolos. Tinción H-E, 40X.

Discusión

El hígado es uno de los principales órganos que resulta afectado por la exposición a Pb y a pesar de muchos años de investigación, la búsqueda de un tratamiento efectivo en el tratamiento de la intoxicación por metales pesados continúa en investigación.

Los parámetros bioquímicos analizados en el presente trabajo, forman parte de las pruebas de rutina que evalúan el funcionamiento hepático (AST, ALT, ALKP). Nos enfocamos en éstas pruebas ya que en resultados anteriores, no reportados, no encontramos cambio en los valores de los parámetros que determinan la capacidad de síntesis (proteínas totales y colesterol) así como en el que determina la capacidad de excreción (bilirrubina total) en ratas que fueron expuestas a Pb. A pesar de que la AST no es un indicador específico de daño hepático, su determinación es útil ya que permite junto con otras pruebas realizar una evaluación integral del funcionamiento de dicho órgano. Los resultados obtenidos en relación al efecto del Pb sobre los parámetros bioquímicos indican que el metal produce alteración en algunos marcadores de daño hepático. Con la dosis de Pb utilizada y las 12 semanas de exposición al metal encontramos únicamente un incremento significativo en el valor de ALT. Estos hallazgos son contrarios a los reportados por otros autores,^{8,21} donde mencionan que el Pb induce incremento en la actividad en suero de las enzimas ALT, AST, gamma glutamil transpeptidasa y ALKP. Las diferencias pueden deberse a los distintos esquemas de intoxicación a Pb a que fueron expuestas las ratas. Sin embargo, las variaciones en los valores, también podemos atribuirlos al amplio intervalo que tienen estos parámetros indicativos del funcionamiento hepático. Por otro lado, los diferentes reportes donde se determinan niveles de referencia de distintos marcadores hepáticos no concuerdan entre sí, aún determinados en la misma especie animal.²²⁻²⁴

A nivel histológico, las alteraciones producidas por Pb, concuerdan con lo reportado en la bibliografía,^{8,20} en relación a las lesiones producidas a nivel de la arquitectura del lobulillo (deformación de la disposición radial de hepatocitos, disminución del tamaño de sinusoides), así como a nivel celular y nuclear (presencia de vacuolas y núcleos picnóticos). Estos resultados son interesantes ya que a pesar de que no fue posible detectar una alteración en todos los parámetros bioquímicos evaluados si fue posible encontrar daño a nivel histológico lo que nos hace pensar que éste daño ocurre mucho antes de que puedan determinarse estas alteraciones a nivel bioquímico. En este sentido, resultaría interesante evaluar el daño histológico a diferentes tiempos de exposición a Pb para determinar el tiempo en que ocurre un incremento en suero de las enzimas AST y ALT atribuido al daño estructural hepático, ya que estas enzimas son localizadas en el citoplasma y liberadas a la circulación sólo después de que ocurre una lesión.

La terapéutica de la intoxicación por Pb se basa en el uso de compuestos quelantes, los cuales eliminan al metal del organismo mediante la formación de compuestos coordinados. Sin embargo, dado que entre los múltiples efectos del Pb, están los ocasionados por la generación de radicales libres de oxígeno

y el abatimiento del sistema de defensa antioxidante celular, en la actualidad se han evaluado diversos antioxidantes,²⁵ entre ellos ácido ascórbico y tiamina con el objetivo de prevenir o revertir el daño ocasionado por el Pb en diversos tejidos.^{8,18,20,26}

En este estudio encontramos que el tratamiento con los antioxidantes tiamina y ácido ascórbico, administrados en dosis baja y alta de forma individual o combinada originó resultados diferentes en relación a las alteraciones histológicas producidas por el metal. Sin embargo, en menor o mayor grado con todos los tratamientos se obtuvo mejoría tanto en la reorganización del lobulillo como a nivel celular originando una mejor disposición radial de los hepatocitos, disminución de cromatina condensada y aumento de nucléolos. En este sentido, es importante considerar que este efecto puede deberse a la acción reportada para la tiamina en relación a la capacidad que tiene para reducir la acumulación de Pb en diversos órganos y al efecto sinérgico que se ha observado cuando se combina con ácido ascórbico.^{18,27} Por otro lado, con la administración conjunta de ambos antioxidantes fue evidente la disminución de los niveles de ALT, AST y ALKP, algunos de ellos aun por debajo del control negativo. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Alcázar-Montenegro y cols²⁸ donde mencionan que en un estudio realizado en pacientes con diversas hepatopatías, estos marcadores hepáticos disminuyen significativamente por efecto de la administración de pirofosfato de tiamina, después de permanecer elevados debido a distintas disfuncionalidades hepáticas. Asimismo demostraron que la tiamina, no provoca cambios en la morfología o funcionalidad del hepatocito al ser utilizado de forma crónica.²⁹

En este estudio se demostró que el modelo de intoxicación por Pb utilizado, no produjo una variación significativa en las enzimas hepáticas, aunque, sí fue posible encontrar alteraciones en el tejido hepático tanto a nivel de la disposición radial de hepatocitos y sinusoides como en las características nucleares. En este sentido, cabe la posibilidad de que la tiamina y el ácido ascórbico jueguen un papel importante en la reversión del daño hepático producido por Pb, al observar mejoría en algunos cambios histológicos, a pesar de haber todavía focos de daño a nivel celular.

En conclusión, la administración de ácido ascórbico y/o tiamina produjo una variación significativa, favorable, en la mayoría de las pruebas evaluadas, sin embargo, persisten algunas alteraciones histológicas en grado variable, sugiriendo que el tratamiento a base de estos antioxidantes puede ser útil para revertir parcialmente las alteraciones provocadas por exposición a Pb.

Agradecimientos

Los autores agradecen al CONCYTEG y DAIP por el apoyo otorgado mediante los proyectos 09-16-K662-077 y 117/09.

Referencias

1. Patra RC, Rautray AK, Swarup D. Oxidative stress in lead and cadmium toxicity and its amelioration. *Vet Med In*. 2011. doi:10.4061/2011/457327.
2. Olewińska E, Kasperczyk A, Kapka L, Kozłowska A, Pawlas N, Dobrakowski M, Birkner E, Kasperczyk S. Level of DNA damage in lead-exposed workers. *Ann Agric Environ Med*. 2010; 17(2):231-236.
3. Mudipalli A. Lead hepatotoxicity & potential health effects. *Indian J Med Res*. 2007; 126(6):518-527.
4. Kumar MR, Reddy KS, Reddy AG, Reddy RA, Anjaneyulu Y, Reddy DG. Lead-induced hepatotoxicity and evaluation of certain anti-stress adaptogens in poultry. *Toxicol Int*. 2011; 18(1): 62-66.
5. Lakshmi DU, Adilaxmamma K, Reddy AG, Rao VV. Evaluation of herbal methionine and mangifera indica against lead-induced organ toxicity in broilers. *Toxicol Int*. 2011; 18(1):58-61.
6. Hsiao CY, Wu HD, Lai JS, Kuo HW. A longitudinal study of the effects of long-term exposure to lead among lead battery factory workers in Taiwan (1989-1999). *Sci Total Environ*. 2001; 279:151-158.
7. Al Neamy FR, Almeshidi AM, Alwash R, Pasha MA, Ibrahim A, Bener A. Occupational lead exposure and aminoacid profiles and liver function tests in industrial workers. *Int J Environ Health Res*. 2001; 11:181-188.
8. Shalan MG, Mostafa MS, Hassouna MM, El-Nabi SE, El-Refaie A. Amelioration of lead toxicity on rat liver with vitamin C and silymarin supplements. *Toxicology*. 2005; 206(1):1-15.
9. Sharifi AM, Baniasadi S, Jorjani M, Rahimi F. Investigation of acute lead poisoning on apoptosis in rat hippocampus in vivo. *Neurosci Lett*. 2002; 329(1):45-48.
10. Davidovics W, DiCicco-Bloom E. Moderate lead exposure elicits neurotrophic effects in cerebral cortical precursor cells in culture. *J Neurosci Res*. 2005; 80(6):817-825.
11. Massó EL, Corredor L, Antonio MT. Oxidative damage in liver after perinatal intoxication with lead and/or cadmium. *J Trace Elem Med Biol*. 2007; 21(3):210-216.
12. Neal R, Cooper K, Kellogg G, Gurer H, Ercal N. Effects of some sulfur-containing antioxidants on lead-exposed lenses. *Free Radic Biol Med*. 1999; 26(1-2):239-243.
13. Gurer H, Ozgunes H, Saygin E, Ercal N. Antioxidant effect of taurine against lead-induced oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol*. 2001; 41(4):397-402.

14. Flora JS, Pande M, Mehta A. Beneficial effect of combined administration of some naturally occurring antioxidants (vitamins) and thiol chelators in the treatment of chronic lead intoxication. *Chem Biol Inter.* 2003; 145:267-280.
15. Alcaraz-Contreras Y, Garza-Ocañas L, Carcaño-Díaz K, Ramírez-Gómez XS. Effect of Glycine on Lead Mobilization, Lead-induced Oxidative Stress and Hepatic Toxicity in Rats. *Journal of Toxicology.* 2011. doi:10.1155/2011/430539.
16. Alcaraz CY., Torres AO, Garza OL., Luján RR., Ramírez GX. Evaluación del efecto de la combinación del ácido 2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) y ácido ascórbico como terapia en la intoxicación por plomo en ratas. *Ciencia UANL.* 2006; 9(1):33-40.
17. Wang C, Liang J, Zhang C, Bi Y, Shi X, Shi Q. Effect of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in liver. *Ann Occup Hyg.* 2007; 51(6):563-569.
18. Shan G, Tang T, Zhang X. The protective effect of ascorbic acid and thiamine supplementation against damage caused by lead in the testes of mice. *J Huazhong Univ Sci Technol [Med Sci].* 2009; 29(1):68-72.
19. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Disponible en: <http://www.sagarpa.gob.mx/Dgg/NOM/062zoo.pdf>
20. Wang C, Zhang Y, Liang J, Shan G, Wang Y, Shi Q. Impacts of ascorbic acid and thiamine supplementation at different concentrations on lead toxicity in testis. *Clin Chim Acta.* 2006; 370(1-2):82-88.
21. Upadhyay AK, Mathur R, Bhadauria M, Nirala SK. Therapeutic influence of zinc and ascorbic acid against lead induced biochemical alterations. *Therapie.* 2009; 64(6):383-388.
22. Al-Attar AM. Physiological and histopathological investigations on the effects of α -lipoic acid in rats exposed to malathion. *J Biomed Biotechnol.* 2010. doi:10.1155/2010/203503.
23. Nwozo SO, Oyinloye BE. Hepatoprotective effect of aqueous extract of *Aframomum melegueta* on ethanol induced toxicity in rats. *Acta Biochim Pol.* 2011; 58(3):355-358.
24. Shaban El-Neweshy M, Said El-Sayed Y. Influence of vitamin C supplementation on lead-induced histopathological alterations in male rats. *Exp Toxicol Pathol.* 2011; 63(3):221-227.
25. Flora SJ, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy. *Indian J Med Res.* 2008. 128:501-523.
26. Patra RC, Swarup D, Dwivedi SK. Antioxidant effects of alpha tocopherol, ascorbic acid and l-methionine on lead induced oxidative stress to the liver, kidney and brain in rats. *Toxicology.* 2001; 162(2):81-88.
27. Reddy SY, Pullakhandam R, Dinesh KB. Thiamine reduces tissue lead levels in rats: mechanism of interaction. *Biometals.* 2010; 23(2):247-253.
28. Alcázar-Montenegro H, Alcázar-Leyva S, Aguirre-Benítez E, Alvarado-Vásquez N, Rivera-López RM, Gámez-Murrieta A, Benítez-Rodríguez MT. Disfunciones hepáticas tratadas con pirofosfato de tiamina. Resultados clínicos y de laboratorio. *Bioquímica.* 2000; 25(2): 45-48.
29. Alcázar-Montenegro H, Aguirre-Benítez E, Alcázar-Leyva S, Alvarado-Vásquez N, Benítez-Rodríguez MT. Efecto del pirofosfato de tiamina en la morfología del hepatocito normal y en el potencial de membrana de células hepáticas, de cerebro y cerebelo de ratas intoxicadas con CCl₄. *Bioquímica,* 2000; 25(3):79-83.