

Efecto de la ranitidina en los niveles séricos de elastasa leucocitaria, en el síndrome de isquemia-reperfusión en hígado de ratas

Mayor M.C. Francisco Alfonso **Viveros-Carreño**,* Mayor M.C. Jaime **Pares Hipólito**,**
Mayor M.C. Esaú **Floriano-Sánchez**,*** Tte. Cor. M.C. Mario **Navarrete-Arellano******

Escuela Militar de Graduados de Sanidad. Laboratorio de Biología Molecular, Ciudad de México.

RESUMEN

Introducción. La lesión por isquemia-reperfusión es un evento bioquímico celular y se detecta en situaciones de trasplantes, choque hipovolémico, síndrome abdominal compartimental y otros donde hay isquemia-reperfusión. La elastasa del neutrófilo es una proteasa contenida en los gránulos azurófilos de los neutrófilos. El clorhidrato de ranitidina puede demostrar un efecto potencial sobre los receptores H₂ situados en la membrana celular de los neutrófilos, disminuyendo la liberación de elastasa desde los gránulos, luego bajando los niveles séricos de la misma.

Objetivo. Ver el efecto que tiene el clorhidrato de ranitidina sobre los niveles séricos de elastasa leucocitaria en un modelo de isquemia-reperfusión inducida en hígado de ratas. Estudio experimental, prospectivo, controlado.

Material y métodos. Sesenta ratas hembras Wistar con peso 239 ± 30.09 g, fueron divididas en cuatro grupos más el control, como sigue: I (10), II (10), III (20) y IV (20); en los grupos II, III y IV que fueron sometidos a isquemia 15, 30, 45 y 60 minutos y a reperfusión por 30 minutos; el clorhidrato de ranitidina fue ministrado intravenosamente a dosis de 0.5 y 5 mg/kg a la mitad de la isquemia. Se tomaron muestras sanguíneas a través del catéter, en el momento de la reperfusión y procesada con sustrato para medir por espectrofotometría la reacción enzima-sustrato.

Resultados. Los niveles de sustrato para el grupo I no disminuyeron cuando se comparó con el grupo Sham. Sin embargo, hubo diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los grupos II, III y IV, los cuales mostraron disminución de los niveles de sustrato, el cual se recuperó a una meseta luego de ministrar una dosis de clorhidrato de ranitidina sea a 0.5 o 5 mg/kg.

Role of ranitidine hydrochloride on leukocyte-elastase seric levels in ischemia-reperfusion injury of rat liver

SUMMARY

Background. Ischemia-reperfusion injury is a cellular-biochemical event and is encountered in transplants, hypovolemic shock, compartment abdominal syndrome and other situations where there are ischemia-reperfusion, neutrophil-elastase is a protease into azurophilic granules of neutrophils, ranitidine hydrochloride, may exhibit a potential effect over H₂-receptors on neutrophil, then lower seric levels and release of elastase from the granules.

Objective. See the role of ranitidine hydrochloride on neutrophil-elastase seric levels in a model of ischemia-reperfusion -induced liver injury in rats.

Design. Prospective, controlled study.

Methods. Sixty female Wistar rats weighing 239 ± 30.09 g were divided in four groups plus control group: I (10), II (10), III (20), IV (20); II, III, and IV groups with hepatic ischemia for 15, 30, 45 and 60 minutes and reperfusion for 30 minutes were applied; ranitidine hydrochloride was administered intravenous 0.5 and 5 mg/kg middle ischemia; blood specimens were obtained in reperfusion time to determine the substrate-enzyme reaction.

Results. Substrate levels in I group did not decrease when compared with Sham group; however, statistically significant differences ($p < 0.05$) were observed between II, III and IV groups, with did decrease in elastase-substrate levels, after that was returned the substrate levels when ranitidine hydrochloride (0.5 or 5 mg/kg) was administered.

* Graduado del Curso de Cirugía Pediátrica, Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ** Jefe de Curso de Farmacología, Escuela Militar de Graduados de Sanidad. *** Alumno del último año de la Maestría en Biología Molecular, Escuela Militar de Graduados de Sanidad. **** Jefe del Área de Pediatría, Hospital Central Militar y Jefe del Curso de Cirugía Pediátrica, Escuela Militar de Graduados de Sanidad.

Correspondencia: Dr. Francisco Alfonso Viveros Carreño
Hospital Militar Regional de Puebla, Av. Calera # 49, Col. Héroes de Puebla, C.P. 72380

Recibido: Agosto 7, 2002.

Aceptado: Septiembre 16, 2002.

Conclusiones. Este estudio demostró que durante un evento de isquemia-reperusión, la infusión de clorhidrato de ranitidina impide la prolongación de la lesión hecha por la elastasa durante la reperusión hepática al inhibir la liberación de elastasa del neutrófilo desde los neutrófilos activados.

Palabras clave: clorhidrato de ranitidina, neutrófilo, elastasa del neutrófilo, lesión hepática, lesión por isquemia-reperusión.

Introducción

La isquemia es un evento bioquímico-celular al cual estamos relacionados, como cirujanos, cada día por las consecuencias graves que consigo trae.

Detrás de la isquemia sigue la reperusión, proceso que causa más daño bioquímico y celular que el primer evento.

El síndrome de isquemia-reperusión (I-R) es manifestado por cambios hemodinámicos, respiratorios y cambios en la permeabilidad de la microvasculatura de la economía. La lesión I-R la vemos en el paciente postoperado de trasplante (hepático, renal, intestinal, complejo cardio-pulmonar), en choque hipovolémico, torsión de órganos, en el síndrome de abdominal compartimental, etc.

De interés son los siguientes puntos que fundamentan la constante investigación sobre el síndrome I-R: primero, la reperusión *per se* produce más lesión tisular que la que induce la isquemia sola; segundo, a fondo, el neutrófilo se encuentra siempre en los tejidos sometidos a I-R, liberando mediadores químicos y enzimas proteolíticas poderosas.¹

Por otro lado, el hígado es muy sensible a la hipoxia asociada a hipovolemia o estado de choque o a pobre circulación posterior a un trasplante.

En las fases tempranas de la reperusión aparecen edema de las células endoteliales, vasoconstricción, reclutamiento de neutrófilos y agregación plaquetaria en los sinusoides hepáticos; posterior a éste hay leucoestasis, aumenta el contacto entre los leucocitos-células endoteliales, prolongando el periodo de hipoxia e isquemia en otras áreas del hígado aun después de iniciada la reperusión, esto es seguido por la activación de las células de Kupffer y los neutrófilos, los cuales producen citoquinas, inflamatorias y radicales libres de oxígeno, aumentando la quimiotaxis, probablemente estimulando a los macrófagos para liberar ltb 4, por tanto, agravando y perpetuando la lesión a los hepatocitos y a su tejido de sostén.^{6,7}

La elastasa del neutrófilo es una de las proteasas liberadas durante la anoxia, pero no se ha entendido bien el papel que tiene esta enzima en la patogénesis de lesión hepática por I-R.² Está contenida en los gránulos azurófilos de los neutrófilos; durante la fagocitosis o pinocitosis estos organelos se fusionan con las vesículas pinocíticas, por tanto liberando la enzima para degradar el material ingerido o la proteasa es liberada en el microambiente intercelular, atacando los enlaces entre aminoácidos de la elastina, proteo-

Conclusions. This study showed that during ischemia-reperfusion event, ranitidine hydrochloride infusion, prevents elastase-reperfusion injury by inhibiting the release of neutrophil-elastase of activated neutrophils.

Key words: Ranitidine, hydrochloride, neutrophil, neutrophil-elastase, liver injury, ischemia-reperfusion injury.

glicanos del cartílago, colágena (tipos I, II, III, IV, VIII, IX, X y XI), laminina y fibronectina.^{3,4} También rompe los enlaces de la inmunoglobulina g, inmunoglobulina m, complemento c3 y c5, asimismo, inactiva los factores de coagulación VII, VIII, X, XII y XIII, a la proteína c y destruye la actividad biológica del factor de necrosis tumoral alfa.

La elastasa es formada por una cadena simple de 218 residuos de aminoácidos y cuatro puentes disulfuro.⁴

Se ha demostrado que los neutrófilos, su elastasa y la presencia de un microambiente, juegan un papel importante en la patogénesis de la destrucción endotelial, en un evento de isquemia-reperusión de todos los órganos afectados.

Se sabe que la ranitidina disminuye la progresión de la lesión de la mucosa gástrica, por inhibición de la acción de los neutrófilos en este nivel.^{5,8}

En el presente estudio, nosotros investigamos el efecto que tiene la ranitidina a diferentes dosis (0.5 mg/kg/dosis y 5 mg/kg/dosis), sobre los neutrófilos, con la consecuente liberación de elastasa, durante eventos de isquemia-reperusión en la unidad de tiempo, en un modelo de experimentación en animales de laboratorio.

Material y métodos

Substrato de elastasa leucocitaria (n-metoxisuccinil-alala-pro-val-p-nitroanilida, n-maapv-p-na, c27 h 38 n5 o9);^{9,10} número de catálogo m 4765 de Sigma Chemical Co. USA. Sesenta (60) ratas Wistar hembras, adultos con peso de 239.8 ± 30.09 g espectrofotómetro, Carl Zeiss, pm 2 a, Germany. Equipo de microcirugía (pinzas de disección vascular, tijera de iris, clips). Material de sutura fino (seda 5-0), guantes de látex, bata, cubrebocas, pentobarbital sódico (sedal-vet 6.3 g/100 mL, Lab. Ttokkyo, S. A. de C.V., Méx.). Clorhidrato de ranitidina líquida (ámpula 2 mg/mL). Lámpara de iluminación, lupas, bolsas de polietileno, centrífuga 5415-c Eppendorf.

Designación de grupos,¹³ en ambiente con temperatura, humedad e iluminación habituales en ayuno:

Grupo I: 10 ratas Wistar, adultos, hembras, recibieron ministración de ranitidina a 0.5 mg/kg/dosis, sin someterlas a síndrome de isquemia-reperusión, en los próximos 15, 30, 45 y 60 min.

Grupo II: 10 ratas Wistar, adultos, hembras, sometidas a isquemia-reperusión, clipando la arteria hepática común y la vena porta, en los próximos 15, 30, 45 y 60 min.

Grupo III: 20 ratas Wistar, adultos, hembras, sometidas a isquemia-reperfusión, clipando la arteria hepática común y la vena porta y ministración de ranitidina a 0.5 mg/kg/dosis y determinación por espectrofotometría, la actividad enzimática de elastasa leucocitaria (EL) sobre el sustrato en el tiempo referido.

Grupo IV: 20 ratas Wistar, adultos, hembras sometidas a isquemia-reperfusión, clipando arteria hepática común y vena porta; ministración de ranitidina a 5 mg/kg/dosis, con determinación por espectrofotometría de actividad enzimática de él sobre el sustrato en el tiempo descrito.

Grupo control o ratas Sham (n = 10), no fueron sometidas a isquemia-reperfusión ni se les ministró alguna dosis de ranitidina, pero fueron anestesiadas, se les colocó catéter venoso yugular y practicó celiotomía en la unidad de tiempo.

Ratas adultas hembras Wistar (Bioterio Escuela Militar de Graduados de Sanidad, México, D.F.), con peso promedio de 239 ± 30.09 g, con cinco horas de ayuno, a humedad y temperatura ambiente, a las 18:00 horas del día fueron anestesiadas vía intraperitoneal con pentobarbital sódico a 50 mcg/kg/dosis (sedal-vet 6.3 g/100 mL, Lab. Ttokkyo, S.A. de C.V., México), colocadas en placa de madera, bajo lámpara de calor radiante se practicó: traqueostomía en línea media cervical, con colocación de cánula endotraqueal y fijación con seda 4-0. Acceso vascular en vena yugular externa derecha y ligadura seda 5-0, con colocación de catéter de polietileno (d.i. 0.58 mm, Intramedic Bectum Dickinson, Co. USA) hasta nivel próximo de afluencia de venas suprahepáticas o catéter per-q-cath 3 fr. laparotomía media, exposición y protección visceral dentro de bolsa de polietileno (a fin de evitar pérdidas de calor). Referencia con clipaje temporal¹⁴ de: vena porta, arteria hepática común. Cierre temporal de cavidad abdominal con material de sutura seda 4-0, dentro de bolsa de polietileno. Toma de tiempos: 15, 30, 45 y 60 minutos de isquemia-reperfusión hepática. Retiro de pinzas de clipaje, toma de muestra sanguínea por catéter en vena cava inferior en la unidad de tiempo.

La elastasa leucocitaria (EL) fue determinada en placas de espectrofotómetro por la medida de la absorbancia de la p-nitroanilida (producto) resultado de la hidrólisis del complejo elastasa leucocitaria-péptido específico (n-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida); la cantidad de 4-nitroanilida liberada es medida por incremento en la absorbancia de 545 nm durante la acción cromógena enzima-sustrato.³ Este método mide la EL libre y la EL unida a- α_2 macroglobulina.¹¹

Preparación del sustrato n-metoxisuccinil-ala-ala-pro-val-p-nitroanilida (n-maapv-p-na, producto m 4765, pm 590.60, sigma Co. USA): 14.8 mg n-maapv-p-na más 2.5 mL dimetilsulfóxido. Diluir en 25 mL de agua destilada, para obtener una concentración de sustrato de 2 mmol/L. Se tomaron alícuotas de 200 μ L, toma de muestra sanguínea a través del catéter mencionado arriba en vena yugular externa con punta situada a nivel de fluencia de venas suprahepáticas: en cada grupo de ratas se tomó muestra sanguínea de 2 mL, centrifugación a 5,000 rpm (centrífuga 5,415-c, Eppendorf), para la separación de paquete globu-

lar de suero. Almacenamiento a -20 °C hasta el momento del ensayo.

Preparación de buffer¹² y activador: hepes (ácido n-2-hidroxiethylpiperazina-n-2-etanesulfónico) a pH 7.5; hepes 0.953 g más H₂O destilada para llevar a 40 mL, titulando con NaOH 10 n para alcanzar concentración 0.1 M a pH 7.5. Almacenar a 4 °C. Activador de reacción enzima-sustrato (nhadinaf): nitrato de sodio 0.6 g (0.04% m/v) en HCl 9.6 mL (0.48 mol/L) aforar a 20 cc con H₂O. Tomar de esta solución 600 μ L; sulfamato de amonio 0.15 g (0.3% m/v) más diclorhidrato de n-1-naftiletilediamina 0.035 g (0.07% m/v). Aforar a 50 mL con H₂O destilada.

Reacción enzima-sustrato (El-n-maapv-p-na): actividad hidrolítica de la EL con técnica de Nakajima modificada.^{11,12,15} Colocar 200 μ L de buffer (Hepes, pH 7.5) más 200 μ L de suero sanguíneo en tubo Eppendorf, agregar 200 μ L de n-maapv-p-na. Incubar a 37 °C, por tres horas, en baño maría (bomba cicladora de agua con regulador de temperatura, marca Haake E-1, Germany). Agregar 200 μ L de nhadinaf. Medir con espectrofotómetro (marca Carl Zeiss, PM 2 A, Germany) a una absorbancia de 545 nm.

Método estadístico: t-test de Student para comparaciones simples,¹⁶ media y desviación estándar para comparaciones de variables independientes y gráficos (lineales con desviación estándar y en cajas unidas).^{16,17}

Resultados

La muestra de suero reperfundido en cada grupo (I, II, III y IV), llámese con o sin isquemia-reperfusión hepática, con o sin ministración de una dosis de ranitidina vía catéter (0.5 mg/kg/dosis o 5 mg/kg/dosis), fue procesado conforme señala el método, antes de leerlo en espectrofotometría.

La media de cada medición en la unidad de tiempo fue comparada entre los grupos.

Las ratas que no fueron sometidas a isquemia-reperfusión hepática en la unidad de tiempo, pero que se les ministró ranitidina 0.5 mg/kg/dosis (Figura 1, grupo I), por catéter venoso, no demostraron cambios en el consumo de EL sustrato de la elastasa del neutrófilo (n-maapv p-na), puesto que esta enzima no se liberó, comparado con el grupo control o de procedimiento Sham (sin ranitidina, sin isquemia-reperfusión).

El grupo II, que se sometió a isquemia-reperfusión en la unidad de tiempo, pero sin la ministración de ranitidina, comparado con el grupo control (Figura 2), manifestó caída de la curva de absorbancia, que puede ser explicado por el consumo del sustrato n-maapv p-na por la elastasa del neutrófilo.

Los animales sometidos a I-R hepática, con la ministración de ranitidina a 0.5 mg/kg/dosis (grupo III), manifestaron caída de la absorbancia en los primeros 30 minutos, con la elevación de la curva de la misma en las mediciones posteriores, probablemente, explicado por la acción de la ranitidina sobre los neutrófilos a nivel de sus receptores en la membrana celular, por lo tanto, se bloquea la liberación de

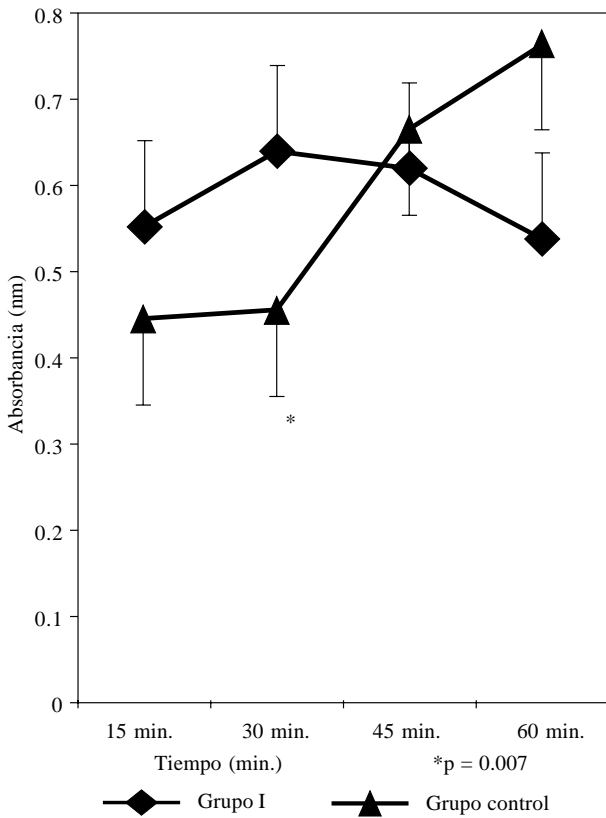


Figura 1. Ranitidina (0.5 mg/kg/dosis), sin I-R hepática, en la unidad de tiempo (min.). Medición de la acción: elastasa del neutrófilo - n-maapv-p-na (absorbancia, nm).

la elastasa en el microambiente y, por lo tanto, no hay consumo de sustrato n-maapv p-na, comparado con el grupo control (Figura 3).

Por otro lado, el grupo IV, cuyos animales recibieron I-R hepática en la unidad del tiempo, ministrándoles ranitidina a 5 mg/kg/dosis, intravenosa por catéter, se muestra en la figura 4.

Obsérvese la caída de los niveles de sustrato (determinada indirectamente por absorbancia) en los primeros 30 minutos, seguido de una meseta en la curva en los minutos posteriores, de lo cual se puede deducir que la enzima elastasa del neutrófilo ya no ha sido liberada por esta célula, debido a la interacción de la ranitidina sobre el receptor de membrana, comparado con el grupo con procedimiento Sham.

La figura 5 representa la comparación de las dosis de ranitidina (0.5 mg/kg/dosis o 5 mg/kg/dosis), en ratas sometidas a I-R donde se observa en ambas curvas, comparando los grupos III y IV, la caída de la absorbancia, seguido de una elevación y meseta de la curva en la unidad de tiempo (min).

Tanto la dosis de 0.5 mg/kg/ como la dosis 5 mg/kg, tienen un efecto parecido sobre los receptores de membrana del neutrófilo, a mayor dosis no necesariamente producirá más efecto sobre la liberación de elastasa del neutrófilo.

El efecto de la ranitidina a dosis de 0.5 mg/kg en ratas con I-R hepática y no sometidas al evento pueden verse

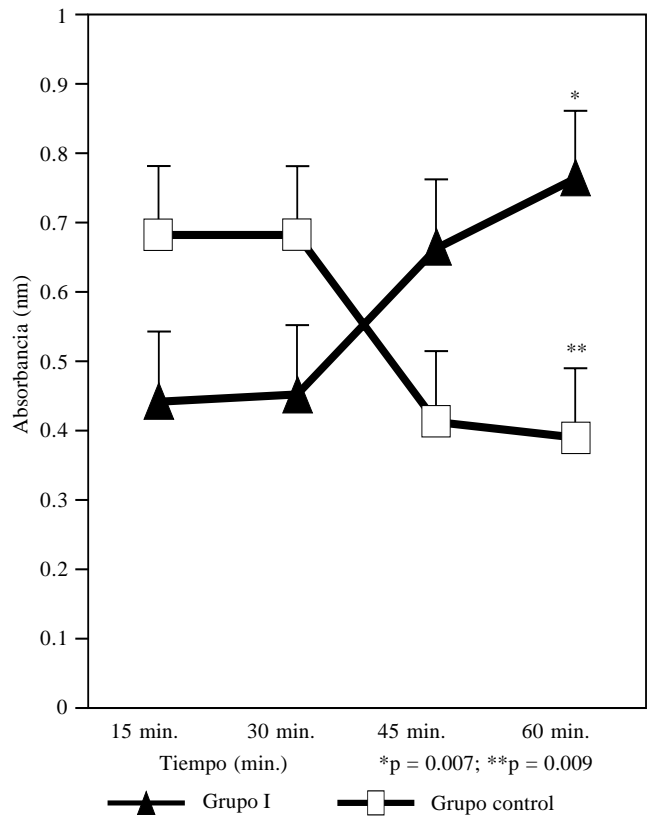


Figura 2. Relación de ratas sometidas a isquemia-reperusión, en la unidad de tiempo (min.), sin ministración de ranitidina. Medición acción elastasa del neutrófilo n-maapv-p-na (absorbancia, nm) contra grupo control (grupo Sham).

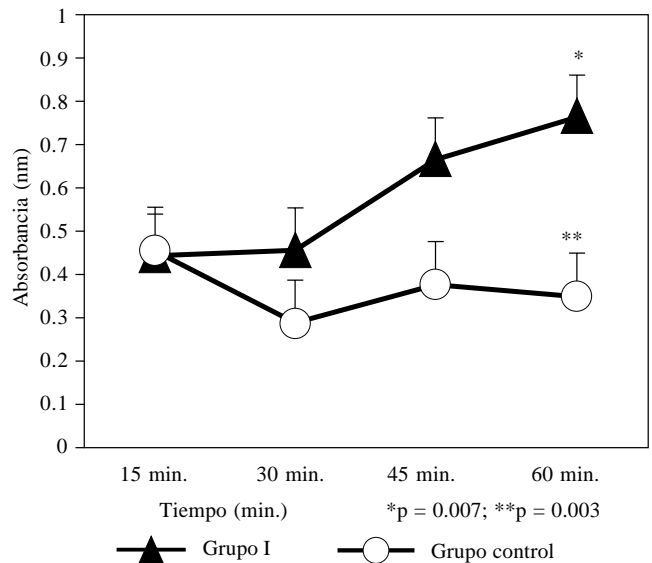


Figura 3. Relación ratas sometidas a isquemia-reperusión + ranitidina (0.5 mg/kg/dosis) en la unidad de tiempo (min.). Acción elastasa del neutrófilo n-maapv-p-na (absorbancia, nm)- contra grupo control (grupo Sham).

en la figura 6. Nótese que en el grupo I, la curva de absorbancia/tiempo (consumo de n-maapv-p-na), no presenta cambios, porque la enzima no está presente. Por otro lado,

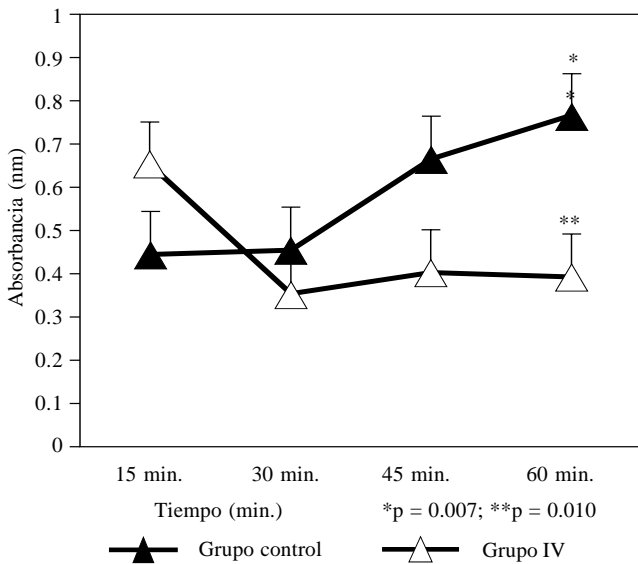


Figura 4. Relación de ratas sometidas a isquemia-reperusión + ranitidina (5 mg/kg/dosis), en la unidad de tiempo (min.). Acción de elastasa del neutrófilo -n-maapv-p-na (absorbancia, nm)- contra grupo control (grupo Sham).

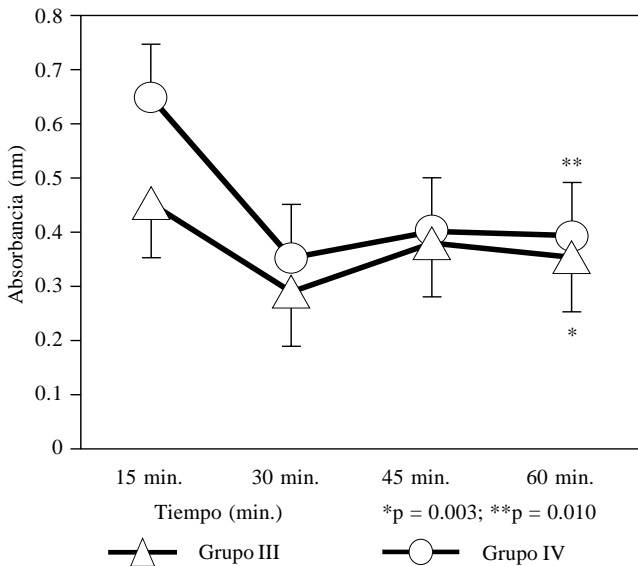


Figura 5. Relación de ratas sometidas a isquemia-reperusión + ranitidina (0.5 mg/kg/dosis) o ranitidina (5 mg/kg/dosis), en la unidad de tiempo (min.). Acción de elastasa del neutrófilo n-maapv-p-na (absorbancia) contra grupo control (grupo Sham).

cuando la elastasa se ha liberado del neutrófilo, consume su sustrato n-maapv-p-na en los primeros minutos; posteriormente la liberación de la proteasa se ve afectada por la acción de la ranitidina sobre los receptores del neutrófilo.

Todos los resultados de las muestras de suero de animales sometidos a I-R, el grupo II sin ranitidina y los grupos III y IV con dosis de bloqueador a 0.5 mg/kg y 5 mg/kg, respectivamente, pueden verse en la figura 7, se hace notar que hay

caída de la curva de absorbancia para el grupo II, comparándose con la elevación y formación de meseta para los grupos III y IV, posterior a la ministración de ranitidina. Si prologáramos la curva del grupo II, ésta seguirá cayendo de manera exponencial, por consumo de la n-maapv-p-na por la elastasa del neutrófilo.

Todos los datos son expresados en media y desviación estandar con $p < 0.05$.

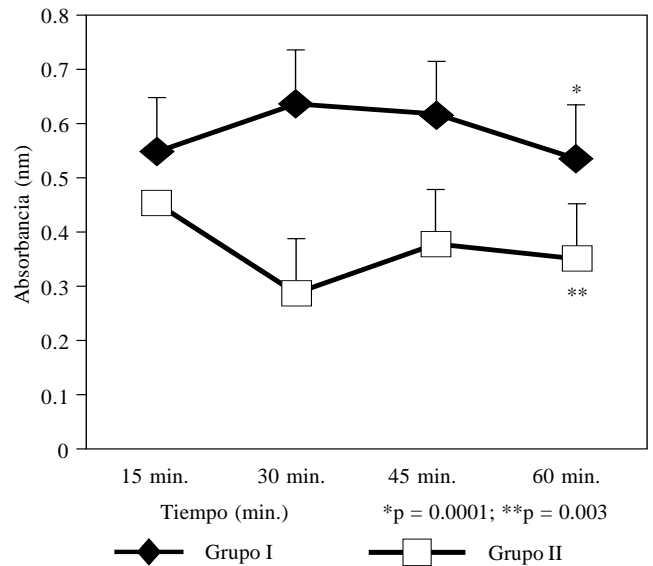


Figura 6. Relación ratas con ministración ranitidina (0.5 mg/kg/dosis), sin isquemia-reperusión y sometidas a isquemia-reperusión, en la unidad de tiempo (min.). Acción de elastasa del neutrófilo n-maapv-p-na, entre grupo I-grupo III.

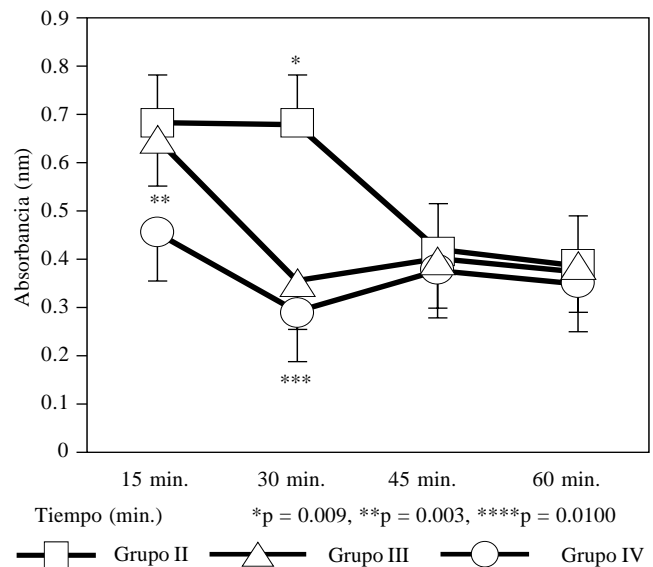


Figura 7. Relación de animales, todos sometidos a isquemia-reperusión, el grupo II sin ranitidina, grupo III y grupo IV, con ranitidina 0.5 mg/kg/dosis y 5 mg/kg/dosis, respectivamente, en la unidad de tiempo. Acción elastasa del neutrófilo n-maapv-p-na.

Discusión

En el presente estudio, la ranitidina, un bloqueador de los receptores H_2 , inhibió la liberación de la enzima elastasa por los neutrófilos reclutados en el evento de isquemia-reperusión, *in vitro*. Esta conclusión es apoyada por el comportamiento que presentó la curva de actividad enzimática de los animales sometidos a isquemia-reperusión sin ministración de ranitidina (*Figura 2*) donde los niveles de substrato (absorbancia en nm), caen indicando de manera indirecta niveles séricos altos de elastasa liberada.

Los neutrófilos son activados por un mecanismo mediado por citoquinas inflamatorias¹⁹ o por la ausencia de O_2 , continuando con la activación de mediadores citoplasmáticos hacia el núcleo y de éste hacia los gránulos azurófilos, los cuales traslocan hacia la membrana celular con la consecuente liberación de la elastasa,^{1,6,24} también podemos especular que la ranitidina puede disminuir la unión del neutrófilo a la célula endotelial interfiriendo entre los receptores de esta última con los receptores cd11b y cd18 expresados en la membrana celular del neutrófilo, por una parte, por otra, bloqueando la activación del receptor H_2 para que no se inicie la liberación de los gránulos azurófilos o la quimiotaxis en un microambiente.^{21,25}

Para el grupo I, donde no hubo evento de isquemia-reperusión, la curva de absorbancia (concentración del substrato) no declinó, porque no se liberó elastasa del neutrófilo.

La concentración del substrato disminuyó cuando el animal fue sometido al evento de anoxia, por la acción de la enzima liberada, como ocurrió en el grupo II.

La caída de n-maapv-p-na por su consumo por la proteasa, con la posterior aparición de una fase de meseta en la curva de concentración, durante la ministración de ranitidina, hace concluir que la enzima quedó dentro del neutrófilo suprimido por acción del medicamento de prueba, como se demuestra con los grupos III y IV. Es importante hacer notar que la acción de la ranitidina sobre el neutrófilo es inmediata, es decir, bloquea la unión cd11b y cd18 a la célula endotelial e impide la liberación de elastasa rápidamente. Como es de notar, en este estudio se demuestra que los efectos a una y otra concentraciones de ranitidina no cambia la curva de reacción enzima-substrato, siendo esto significativo ($p < 0.05$), por lo que la dosis no afecta la liberación de elastasa del neutrófilo (*Figura 5*).

El uso de los inhibidores de la elastasa, en algunos ensayos experimentales en animales, sometidos a isquemia-reperusión intestinal o de otras vísceras, han demostrado que atenúan marcadamente todos los eventos de la lesión por reperusión,²³ la ranitidina no inhibe la acción de la elastasa, mas sí impide su liberación (Okajima).⁸ En la actualidad existen múltiples manejos para disminuir los efectos de la lesión de isquemia-reperusión como son: terapia antioxidante (manitol, vitamina E, n-acetilcisteína, alopurinol), análogos de la lipoxina, antagonistas del calcio, anticuerpos anti-c5 de cadena simple, filtración de leucocitos, anticitoquinas, antago-

nistas de los receptores cd11b y cd 18, antagonistas de factor activador de plaquetas y antagonistas del leucotrieno b_4 .²⁰

Luego entonces, la inhibición específica de la enzima proporcionará una terapia adyuvante para impedir la evolución de la lesión por isquemia-reperusión hepática en un futuro.¹⁸ Falta por correlacionar si esta droga altera la migración del neutrófilo hacia el área de lesión hepática.^{6,18,22}

Conclusiones

- A. La elastasa del neutrófilo siempre está presente en el evento de isquemia-reperusión hepática.
- B. La ranitidina participa de manera directa en el bloqueo de los receptores de membrana del neutrófilo.
- C. Los niveles séricos de elastasa aumentan de manera proporcional al tiempo que dura el evento de isquemia-reperusión.
- D. Los niveles séricos de elastasa disminuyen de manera proporcional al tiempo que dura el evento de isquemia-reperusión, al bloquear su liberación desde el neutrófilo, por la ranitidina.
- E. La concentración de ranitidina no influye de manera significativa en la liberación de elastasa por el neutrófilo.

Referencias

1. Welbourn CR, et al. Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78(6): 651-5.
2. Kushimoto S, et al. Role of granulocyte elastase in ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Cri Care Med* 1996; 24(11): 1908-12.
3. Kilian U. Neutrophile as test system for active substances-enzyme release from azurophilic granula. Institute for medical physics and biophysics, University of Leipzig, Germany 2002. e-mail:kilu@server3.medizin.uni.leipzig.de.
4. Bieth IG. Leukocyte elastase. *Faculté de pharmacie, Illkirch, France* 2002. e-mail: jbbieth@pharma.u-strasbg.fr
5. Mosby's Genrx. Ranitidine hydrochloride. 10/a ed.; Mosby, 2000.
6. Inglott, FS, et al. Hepatic ischemia-reperfusion injury (review). *Am J Surg* 2001; 181: 160-6.
7. Stockley RA. Neutrophils and protease/antiprotease imbalance. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 160: 549-52.
8. Okajima K, et al. Inhibition of neutrophil activation by ranitidine contributes to prevent stress-induced gastric mucosal injury in rats. *Crit Care Med* 2000; 28(8): 2858-65.
9. Catálogo Sigma. Reactivos y productos químicos para la investigación en las ciencias de la vida; 2002-2003, p. 735-1321.
10. Liu Z, et al. A critical role for neutrophil elastase in experimental bullous pemphigoid-infection and immunity. *J Clin Invest* 2000; 105(1): 113-23.
11. Smith QT, et al. Inhibition of crevicular fluid neutrophil elastase by $\alpha 1$ -antitrypsin in periodontal health and disease. *Archs Oral Biol* 1994; 39(4): 301-6.
12. Tanaka H, et al. Role of granulocyte elastase in tissue injury in patients with septic shock complicated by multiple-organ failure. *Ann Surg* 1991; 213(1): 81-5.
13. Vejchapipat P, et al. Moderate hypothermia ameliorates liver energy failure after intestinal ischaemia-reperfusion in anaesthetized rats. *J Pediatr Surg* 2001; 36(2): 269-75.
14. Turnage RH, et al. Intestinal reperfusion-induced pulmonary edema is related to increased pulmonary inducible nitric oxide synthase activity. *Surgery* 1998; 124(2): 457-63.

15. De Marco JL, Felix CR. Characterization of a protease produced by a *Trichoderma harzianum* isolate which controls cocoa plant with a broom disease. *Bioch* 2002; 3: 3.
16. SPSS 9.0 for Windows 1989-1999 SPSS.
17. Microsoft Excel 2000. 1985-1999. MapInfo, Troy, NY.
18. Waxman K. Is a granulocyte elastase the cause of gastric mucosal injury after shock? *Crit Care Med* 1996; 24(6): 914-5.
19. Patrick DA, et al. Nitric oxide attenuates platelet-activating factor priming for elastase release in human neutrophils via a cyclic guanosine monophosphate-dependent pathway. *Surgery* 1997; 122(2): 196-203.
20. Collard ChD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; 94(6).
21. Nielsen HJ, et al. Ranitidine improves postoperative monocyte and neutrophil function. *Arch Surg* 1994; 129: 309-15.
22. Kushimoto S, et al. Role of granulocyte elastase in the formation of hemorrhagic shock-induced gastric mucosal lesions in the rat. *Crit Care Med* 1996; 24(6): 1041-6.
23. Yamaguchi Y, et al. Neutrophil elastase inhibitor reduces neutrophil chemoattractant production after ischemia-reperfusion in rat liver. *Gastroenterology* 1997; 112(2): 551-60.
24. Nadel JA. Role of neutrophil elastase in hypersecretion during COPD exacerbations, and proposed therapies. *Chest* 2000; 117(5), Suppl; 286S-389S.
25. Simpson R, et al. Neutrophil and nonneutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1993; 218(4): 444-54.