



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

SECRETARÍA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL
DIRECCIÓN DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

CURSO UNIVERSITARIO DE ESPECIALIZACIÓN EN:
CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA

**“EFECTIVIDAD DE LA SUPLEMENTACIÓN DE
L-ARGININA EN PACIENTES CON QUEMADURAS DE SEGUNDO
GRADO SUPERFICIAL PARA ACELERAR LA EPITELIZACIÓN”**

TESIS DE POSGRADO
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

ESPECIALISTA EN:
CIRUGÍA PLÁSTICA Y RECONSTRUCTIVA

P R E S E N T A :

DR. EDMUNDO MORALES RAYA

ASESOR:

DRA. LOURDES RODRIGUEZ RODRIGUEZ

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“EFECTIVIDAD DE LA SUPLEMENTACIÓN DE
L-ARGININA EN PACIENTES CON QUEMADURAS DE SEGUNDO GRADO
SUPERFICIAL PARA ACELERAR LA EPITELIZACIÓN”**

AUTOR:

DR. EDMUNDO MORALES RAYA

Vo. Bo.

DR. JORGE GONZÁLEZ RENTERÍA

PROFESOR TITULAR DEL CURSO DE POSGRADO EN
CIRUGÍA PLÁSTICA, ESTÉTICA Y RECONSTRUCTIVA

Vo. Bo.

DR. ANTONIO FRAGA MOURET

DIRECTOR DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN
SECRETARÍA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL

**“EFECTIVIDAD DE LA SUPLEMENTACIÓN DE
L-ARGININA EN PACIENTES CON QUEMADURAS DE SEGUNDO GRADO
SUPERFICIAL PARA ACELERAR LA EPITELIZACION”**

AUTOR:

DR. EDMUNDO MORALES RAYA

Vo. Bo.

DRA. LOURDES RODRIGUEZ RODRIGUEZ

DIRECTORA DE TESIS
MÉDICO ADSCRITO CIRUGÍA PLÁSTICA
HOSPITAL GENERAL “DR. RUBÉN LEÑERO”
CIRUGÍA PLÁSTICA, ESTÉTICA Y RECONSTRUCTIVA
SECRETARIA DE SALUD DEL DISTRITO FEDERAL

ÍNDICE

CONTENIDO	PAG.
I. INTRODUCCIÓN	5
II. MARCO DE REFERENCIA	7
III. HIPÓTESIS	14
IV. JUSTIFICACIÓN	14
V. OBJETIVOS	15
VI. MATERIAL Y MÉTODO	16
VII. RESULTADOS	21
VIII. DISCUSIÓN	27
IX. CONCLUSIONES	28
X. REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS	29

INTRODUCCIÓN

El efecto de la suplementación con arginina sobre la cicatrización de heridas ha sido ampliamente estudiado en animales y ha demostrado efectos benéficos. Una carencia dietética de arginina conduce alteraciones en la cicatrización de las heridas en roedores [1,2] , mientras que la suplementación con arginina conduce a un aumento de la síntesis de colágeno en las heridas, de su resistencia a la ruptura y a su reepitelización [3, 4, 5, 6, 7]. Mientras en humanos los estudios son relativamente escasos y muestran resultados con fallas metodológicas, estos datos han llevado a la producción de suplementos nutricionales orales ya disponible actualmente en el mercado, enriquecidos con arginina, para aumentar la cicatrización de las heridas.

Hasta hoy, sin embargo, el efecto de una suplementación con arginina sobre la evolución clínica de la cicatrización de las heridas en los humanos queda por aclarar. En general, el efecto de la nutrición en la cicatrización de las heridas, está bien establecida [8] . Por el contrario, el papel de la inmunonutrición y sus ingredientes específicos para mejorar la cicatrización es menos investigada [9] . Estudios en humanos sobre el uso de arginina como la inmunonutrición muestran resultados contradictorios. Mientras que algunos estudios no reportan ningún efecto benéfico en la suplementación con arginina sobre los parámetros clínicos o bioquímicos en los pacientes quirúrgicos [10, 11, 12] , otros indican mejoría en la curación de las úlceras en pacientes diabéticos [13], otros muestran una mejoría de la función inmune de los pacientes postquirúrgicos, que resulta en una reducción de infecciones, de complicaciones en las heridas y de la estancia hospitalaria [14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22].

Los estudios experimentales para evaluar los parámetros específicos de la cicatrización de las heridas de pacientes con suplementación con arginina, han involucrado la deposición de colágeno y la epitelización, lo que sería lo más cercano a nuestro objetivo de este estudio, como indicadores de la curación de la herida [23, 24]. Además, otros estudios se han centrado en la mayoría de los pacientes en estado de estrés metabólico, como son pacientes con tumores malignos, diabetes mellitus, úlceras por presión y traumatismos graves. Estos estudios suelen ser de tamaño limitado o expresan la cicatrización de las heridas en términos de infección. Por otra parte, estudios sobre el efecto de la suplementación con arginina en la cicatrización de heridas a menudo se utilizan combinaciones de arginina y otros inmunonutrientes, lo que hace que la interpretación del efecto único de la suplementación con arginina sea imposible [25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32].

Los injertos cutáneos se utilizan con frecuencia en reconstrucción de heridas y en quemaduras. El conocimiento de los posibles medios para mejorar la cicatrización de heridas es particularmente relevante en el tratamiento del paciente quemado, como la toma de un nuevo injerto de una zona donadora previa[33]. Además, una zona donadora es una herida muy homogénea en su cicatrización siendo un adecuado modelo de herida para su estudio.

Por lo tanto, se realiza este estudio con la suplementación con arginina por vía oral en la curación de los sitios donadores de injertos cutáneos de espesor parcial en humanos sanos, teniendo como parámetros de la cicatrización la angiogénesis, reepitelización y la afluencia leucocitaria y con el fin de descartar cualquier influencia en los resultados se homogenizo la curación de las heridas como parámetro clave.

MARCO DE REFERENCIA

El óxido nítrico (NO) se sintetiza a partir de un nitrógeno guanidino de la L-arginina por la acción de una de tres enzimas de la sintetasa del óxido nítrico (NOS), cada una con localización subcelular y celular, secuencia de aminoácidos y regulación diferentes. [35]. Todas requieren fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adedina (NADPH), dinucleótido de flavina y adedina (FAD), mononucleótido de flavina (FMN) y tetrahidrobiopterina (H₄B) como factores.

Dos de estas enzimas, llamadas cNOS, se expresan de manera constitutiva [1]. La sintetasa del óxido nítrico neuronal (nNOS, ncNOS, NOS1), primera en descubrirse, se encuentra en neuronas, músculo esquelético, páncreas y riñón [36,37]. La otra enzima constitutiva, la NOS endotelial (eNOS, ecNOS, NOS3) se encuentra fija sobre todo en la membrana de las células endoteliales, pero puede identificarse también en otros tipos de células (p. Ej., neuronas y miocitos cardiacos) [38]. La regulación postraducciona es extensa en ambas clases de enzimas; sin embargo, los mecanismos dominantes de su activación son movimientos intracelulares fugaces del calcio, que tienen como resultado producción de NO de bajo nivel en plazo de unos cuantos minutos [39,40].

En contraste, la NOS induce (iNOS, NOS2) no se expresa de manera típica en las células que se encuentran en estado basal [41]. Aislada por primera vez a partir de macrófagos activados, esta enzima puede expresarse en casi todos los tejidos bajo las condiciones apropiadas [36,42]. La iNOS se sintetiza de novo como reacción a citosinas, microorganismos, productos microbianos e hipoxia y da por resultado producción sostenida de NO [41,42]. Una vez formada, la iNOS se conserva en estado activo mediante un enlace de calmodulina a la enzima independiente de los aumentos del calcio [43]. Esto da lugar a una descarga mucho más grande de NO, limitada sólo por la concentración de la enzima y la disponibilidad de sustrato y cofactor.

LA FUNCIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA REPARACIÓN NORMAL DE LAS HERIDAS

Muchas células participantes en la reparación de las heridas pueden producir NO valiéndose de la síntesis del óxido nítrico endotelial constitutiva (eNOS), o de la isoforma inducible de la enzima (iNOS). Estas células son macrófagos (iNOS) [44], queratinocitos (eNOS e iNOS) [45,46], células endoteliales (eNOS) [47,48] y fibroblastos (eNOS e iNOS) [14, 15]. En contraste con los fibroblastos derivados de la piel normal, los de las heridas experimentales producen NO a partir de la iNOS durante los dos primeros pasos [35,40]. La sintetasa de óxido nítrico induce (iNOS)

aumenta dentro de las primeras 24 horas siguientes a la producción de la herida cutánea, con expresión máxima en plazo de uno a cinco días [51]. En las úlceras gástricas se incrementan tanto iNOS como eNOS, con concentraciones máximas entre los días tres y seis [52]- En el modelo de herida dérmica de la rata, se demostró iNOS en los macrófagos infiltrativos en plazo de 6 a 24 horas después de producirse la lesión, con disminución gradual de su contenido durante los 10 días siguientes. Confirma esta prueba de la producción de NO tempranamente en la reparación de las heridas, la identificación de concentraciones altas de nitritos y citrulina, productos terminales del metabolismo de las NOS, en el líquido de la herida durante los tres primeros días del proceso de cicatrización [53], e incluso durante la segunda semana [54]. No se ha podido definir con claridad el tiempo que dura la expresión de la NOS y la producción de la NO durante la cicatrización normal de las heridas del ser humano; sin embargo, dentro de las primeras 24 horas que siguen a la lesión, están aumentadas las cifras plasmáticas de nitritos y nitratos los pacientes traumatizados y quemados, en comparación con los testigos [55]. Esto es semejante a lo observado en los estudios en animales.

En 1978 se observó que la arginina que es el sustrato de la sintetasa del óxido nítrico, aceleraba la cicatrización de las heridas [56]. Al principio se postuló un mecanismo inmunitario, pero desde ese entonces se ha demostrado que la complementación dietética con arginina mejora el depósito de colágena y la resistencia de las heridas en el ser humano [57,58] y en modelos animales [59]. Parte de este efecto puede deberse al aumento de la producción de ornitina, precursora de la prolina durante la síntesis de colágena, por acción de la arginasa, que probablemente compite de manera directa con NOS por sustrato [60]. Sin embargo, la observación de que la complementación con arginina no mejora el depósito de colágena en ratos iNOS en la misma extensión que en los animales testigo de tipo salvaje implica al NO como factor en los efectos positivos de la arginina [61].

La función que tiene el NO en la cicatrización normal de las heridas se pone más de relieve con la demostración del trastorno del cierre de las heridas de resección en ratos iNOS, que se corrige después de la restitución adenoviral del gen deficiente [62]. Sin embargo, estos ratones no manifiestan déficit discernible en la resistencia de las heridas a la rotura o en el depósito de colágena después de las incisiones [63]. Los ratones carentes del gen eNOS también presentan retraso del cierre de las heridas y disminución de la resistencia de éstas a la rotura, al igual que el trastorno de la proliferación de capilares por el interior de los tejidos lesionados in vitro [64]. Por añadidura, el bloqueo de la NOS trastorna la cicatrización de las heridas cutáneas y

del tubo digestivo en modelos animales [54, 63, 65, 66], y la complementación de NO por medio de donadores acelera la cicatrización de las heridas [67].

ÓXIDO NÍTRICO EN EL TRASTORNO DE LA CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS

Se ha relacionado a la síntesis deficiente de NO con el trastorno de la cicatrización de las heridas. La mala nutrición de proteínas y calorías no sólo afecta la reparación de las heridas al reducir el depósito de colágena, sino que disminuye además las concentraciones de nitritos y nitratos en el líquido de las lesiones [68]. Los corticoesteroides son inhibidores potentes de la inducción de iNOS [51], y son notorios por sus efectos adversos sobre la curación de las heridas. Se ha demostrado que el exceso de expresión de iNOS en las heridas murinas de resección, tratadas con esteroides, incrementa la cicatrización [69]. Las ratas diabéticas tienen disminución de los nitritos y de los nitratos en el líquido de la herida, al igual que trastorno de la resistencia de la herida a la rotura, y reducción del contenido de colágena de las que están cicatrizando. Tiene interés que el tratamiento con insulina no sólo mejora la resistencia de la herida a la rotura y del depósito de la colágena en estos animales, sino que restaura, en parte, la producción de NO [70]. Los fibroblastos derivados de la cicatrices hipertróficas expresan menos eNOS que los derivados de la piel normal [49], y lo queloides contienen menos mRNA de iNOS y proteínas que las cicatrices normales y las hipertróficas [71].

El exceso de NO durante la curación de las heridas, al igual que su mayor producción en un momento equivocado, puede ser tan dañino como su producción deficiente. Las placas psoriáticas expresan en exceso a la iNOS [72]. Las úlceras venosas crónicas humanas tienen cantidades incrementadas de proteínas iNOS y eNOS en comparación con la piel normal. Se ha demostrado que el tratamiento tópico con un donador de NO (nitroprusiato sódico) disminuye el contenido de colágena en las heridas [73], lo que indica que puede no lograrse beneficio alguno con el exceso de producción abundante de iNOS, pero también disminución de la síntesis de colágena aumento de la presión en las anastomosis del colon, que las hace dehiscentes [74].

Sigue sin aclararse por completo la función precisa del NO en la cicatrización de las heridas de personas diabéticas- En contra de lo que se observa en modelos de roedor, se han informado concentraciones incrementadas de iNOS y eNOS en las úlceras de seres humanos diabéticos (en comparación con la de la piel sana de individuos normales o diabéticos), y estos sujetos tienen aumentados los nitritos plasmáticos. Además, en estas lesiones se encuentra disminuido el factor 1 de

transformación de crecimiento (TGF-beta 1), que inhibe la expresión de iNOS durante la cicatrización de las heridas [75]. Incluso los datos obtenidos de modelos roedores son contradictorios, porque se ha demostrado que las ratas diabéticas reduce su producción de nitratos urinarios después de sufrir heridas [76], en tanto que los macrófagos estimulados de ratos diabéticos producen mucho más NO que los de los ratones no diabéticos [77].

FUNCIONES ESPECIFICAS DEL ÓXIDO NÍTRICO EN LA CICATRIZACIÓN DE LAS HERIDAS

FASE INFLAMATORIA

Al principio, la herida queda poblada por plaquetas y eritrocitos, a lo que sigue infiltración por leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos. La descarga de citosinas quimioatrayentes desde las plaquetas que se degranulan anuncia la iniciación de la fase inflamatoria de la cicatrización de las heridas. La expresión temprana de la iNOS puede haber llegado a su máximo en sólo 48 horas [53], lo que indica que esta enzima es principalmente activa durante la inflamación. Muchos de los efectos primarios del NO, como vasodilatación [78], actividad antimicrobiana [79-83], actividad contra la agregación plaquetaria [84], e inducción de la permeabilidad vascular [85,86], son muy importantes para la fase inflamatoria de la cicatrización de las heridas.

La disminución de la citosina quimiotáctica que atrae monocitos por el NO durante la reparación de las heridas, y en cultivo celular, puede servir para iniciar la transición desde la fase inflamatoria hacia la regenerativa del proceso reparador [87]. Al parecer el NO disminuye también la expresión de la proteína 1 quimioatrayente de los monocitos y macrófagos (MCP-1) por los queratinocitos hiperproliferativos situados en los bordes de la herida in vitro y, posiblemente, in vivo, lo que sugiere un segundo mecanismo por medio del que las cantidades suficientes de NO expresadas durante la inflamación puede hacer avanzar al proceso de reparación de las heridas [88].

PROLIFERACIÓN CELULAR

El NO ejerce efectos variados sobre la proliferación y la diferenciación en distintos tipos de células. Se ha observado que el L-NIL inhibidor de la iNOS disminuye la proliferación de los queratinocitos en el borde de la herida, y que el NO a dosis bajas aumenta su producción in vitro [89], en tanto que las dosis más altas la inhiben [90].

Las mismas citosinas inflamatorias como interferón gamma, lipopolisacárido y factor alfa de necrosis tumoral, que estimulan la expresión de iNOS por los queratinocitos, inhiben el crecimiento de estas células. El factor de crecimiento epidérmico puede anunciar la iniciación de la fase proliferativa de la cicatrización de las heridas al estimular la producción de queratinocitos a la vez que bloquea la de NO derivado de éstos [90]. Los donadores de NO inducen diversificación de los queratinocitos [90], y éstos producen iNOS en cantidades cada vez mayores conforme se diferencian, lo que probablemente disminuye la proliferación al progresar la cicatrización de la herida [46].

De hecho, el tratamiento de las heridas murinas con el inhibidor L-NIL de la iNOS da lugar a retraso de la cicatrización con epitelio hiperproliferativo atrofiado en el borde de la herida [89].

En general, la cantidad del NO para regular la proliferación depende de su concentración y de la sensibilidad de la célula a sus acciones antiproliferativas. Las concentraciones incluso bajas de NO inhiben la producción de los fibroblastos y las células de musculo liso. En contraste, a concentraciones bajas el NO estimula a las células endoteliales y a los queratinocitos para que proliferen, pero la inhiben en condiciones in vitro cuando sus cifras son altas [91,92]. Por añadidura, se ha demostrado que el NO protege a las células endoteliales contra la apoptosis [93] y media la proliferación de las células endoteliales inducida por el factor del crecimiento endotelial vascular (VAGF-, factor de permeabilidad vascular) [94,95].

ANGIOGÉNESIS

Cabe suponer que la formación de nuevos vasos sanguíneos es uno de los componentes más importantes del proceso de reparación normal de las heridas, y al parecer el NO desempeña una función central en este proceso. Se ha demostrado que éste incrementa la angiogénesis en el tejido murino isquémico [96], y que los inhibidores de la eNOS la transforman en el tejido de granulación durante la cicatrización de las úlceras gástricas [52,97]. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es el angiógeno más potente activo durante la reparación de las heridas [98]. El VEGF aumenta la producción de NO por vía de la regulación de la eNOS [13,14]. El efecto angiógeno de este factor parece depender del NO [99,100]. El bloqueo del óxido nítrico previene tanto la proliferación de la célula endotelial inducida por el VEGF, como la activación de la cinasa de proteínas activadora de mitógeno inducida también por el factor [101]. También dependen del NO la migración de la célula endotelial [95,102], la disminución de la adherencia [103] y la organización [94],

estimuladas por el VEGF. Estos efectos dependientes del NO pueden basarse en la iNOS y también en la eNOS [104]. Los queratinocitos son la fuente principal de VEGF por los queratinocitos estimulados por citosinas, que a su vez puede quedar loqueada por los inhibidores de la iNOS in vitro lo mismo que in vivo [106].

La angiogénesis no dependiente del VEGF parece abarbar también al NO. La inducida por monocitos depende de L-arginina y NO [107], Otros fenómenos más, mediados por el NO, son la angiogénesis in vivo mediada por sustancia P, y la proliferación y la migración de las células endoteliales in vitro [108].

Después del crecimiento exitoso de los capilares hacia el interior de los tejidos de la herida, parece entrar en actividad un mecanismo de retroalimentación que disminuye la concentración de VEGF en la herida que cicatriza. El óxido nítrico derivado del endotelio reduce la expresión del VEGF inducida por cinasa C de proteínas (PKC) en las células de musculo liso vasculares vecinas al interferir con la fijación de AP-1 [109].

DEPOSITO Y REMODELACIÓN DE LA MATRIZ

En estudios en animales e in vitro se a descrito con claridad la relación entre el NO y el depósito de colágena. En la mayor parte de las investigaciones el tratamiento con donadores de NO [110], arginina dietética [61], o exceso de expresión de iNOS mediante tratamiento génico [111], incremento el contenido de colágena de la NOS disminuye la formación de colágena y tejido de granulación en las quemaduras experimentales [66]. En un estudio se encontró el efecto opuesto, con disminución del contenido de colágena de la herida después del tratamiento tópico con un donador de NO o arginina, así como mejoría con la inhibición de la NOS [73]. Es probable que el momento y la magnitud de la producción de NO en la herida que está cicatrizando deban equilibrarse cuidadosamente para garantizar un efecto benéfico.

In vitro, tanto los fibroblastos derivados de la herida como los de la piel normal aumentan su producción de ésta posterior a la inhibición de la NOS [50]. Esto parece deberse, principalmente, al incremento postraduccional de la síntesis de colágena, y no a la transcripción de novo de genes importantes de ésta [91].

La función del óxido nítrico en la remodelación y la contracción de las heridas es menos clara- Los ratones tanto iNOS [62] como eNOS [64] tienen retrasos notables del cierre de las heridas. En la rata, esto mejoró con un NONOato en base de polímero tópico [67], lo que parece sugerir la necesidad de óxido nítrico para el cierre de las heridas, aunque estos estudios no permiten distinguir entre la contracción y la reepitelización. Sin embargo, las pruebas obtenidas in vitro se oponen a lo anterior

porque se incrementa la contracción de la colágena producida por los fibroblastos derivados de la herida después de la inhibición de la NOS [50].

HIPOTESIS

Una suplementación dietética con L-Arginina en pacientes con quemaduras de segundo grado superficial favorecerá la cicatrización de las heridas acortando su estancia hospitalaria.

JUSTIFICACIÓN

En México según datos del I.N.E.G.I. existen en toda la república mexicana más de 112,336,538 habitantes, de los cuales en promedio el 62%, ha sufrido algún tipo de Accidente; de cuya cifra son entre 69,648,653 de habitantes y de los cuales el 5.7% ha sufrido y ha tenido que ser atendido por causa de Quemaduras, casi 3,969,973 de estos. Con respecto al lugar de accidente; el hogar es el más frecuente con un 67% en promedio, seguido de la vía pública e industria. En relación con el sexo y edad, encontramos que el hombre se quema con mayor frecuencia que la mujer, siendo en la edad más productiva de su vida, con un promedio del 68% al 32% respectivamente.

Por el gran número de pacientes que sufren quemaduras y el costo que representa su atención médica con una estancia prolongada así como la ausencia en sus actividades laborales, es importante encontrar adyuvantes en el tratamiento del paciente quemado que disminuya su estancia hospitalaria y su pronto regreso laboral.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar la efectividad de la suplementación dietética con L-Arginina en pacientes con quemaduras de segundo grado superficial para favorecer el proceso de cicatrización.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Valorar y caracterizar la fase inflamatoria y proliferativa de la cicatrización de pacientes suplementados con L-Arginina y su comparación con los no suplementados.
2. Valorar y caracterizar la angiogénesis en la cicatrización de pacientes suplementados con L-Arginina y su comparación con los no suplementados.
3. Valorar y caracterizar la reepitelización en el proceso de cicatrización en pacientes suplementados con L-Arginina y su comparación con los no suplementados.

MATERIAL Y MÉTODOS

El presente estudio se llevó a cabo del primero de abril del 2009 al 15 de noviembre de 2009, en el servicio de Quemados del Hospital General “Dr. Rubén Leñero” de la Secretaría de Salud del Gobierno del Distrito Federal con un total de 20 pacientes con diagnóstico de quemadura de segundo grado superficial de no menor 40 % y no mayor de 50% de superficie corporal total.

UNIVERSO DE ESTUDIO

Formado por pacientes que, durante el periodo de estudio, ingresaron al servicio de Quemados del Hospital General “Dr. Rubén Leñero” con el diagnóstico de quemaduras de segundo grado superficial y profundo de no menor de 40% y no mayor de 50% de superficie corporal quemada.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- 1.- Hombres y Mujeres
- 2.- Edad mayor o igual a 20 años y menor o igual de 70 años
- 3.- Ninguna otra morbilidad previa a la quemadura (Diabetes Mellitus, Hipertensión, Desnutrición, Toxicomanías)
- 4.- Quemadura de 2º grado superficial y profundo mayor del 40% y menor de 50% de superficie corporal total.
- 5.- Paciente que su tratamiento incluirá toma y aplicación de injerto cutáneo de espesor intermedio de 0.015 pulgadas.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- 1.- Co-Morbilidad preexistente (Diabetes Mellitus, Hipertensión arterial, Desnutrición, Toxicomanías)
- 2.- Menores de 20 años de edad y mayores de 70 años
- 3.- Pacientes que no acepten el tratamiento especificado.
- 4.- Pacientes alérgicos a la L-Arginina
- 5.- Pacientes que no requerirán injerto cutáneo.

CRITERIOS DE ELIMINACION

- 1.- Pacientes que desarrollen otra Co-Morbilidad en su internamiento (Infección, Sepsis, Diabetes Mellitus, Hipertensión Desnutrición).
- 2.- Pacientes que no se apeguen al tratamiento especificado.
- 3.- Pacientes que desarrollen alguna hipersensibilidad a la L-Arginina
- 4.- Paciente que se les realiza toma y aplicación de injerto cutáneo que no sea de 0.015 pulgadas.
- 5.- Uso de otro tipo de curación en la área donadora que no sea solamente cubierta de organdí y rifamicina spray al 1%.

ESTUDIOS PRE-TRATAMIENTO

A todos los pacientes incluidos en el estudio se les realizó historia clínica completa, así mismo se les completó el protocolo de internamiento hospitalario que consiste en la realización de paraclínicos,: Biometría Hemática, Química (Hemoglobina, Leucocitos, Hematocrito, Plaquetas) Cínica (Glucosa, Urea, Creatinina, Proteínas Totales, Albumina, Colesterol), Electrolitos Séricos (Sodio, Potasio, Cloro), Tiempos de Coagulación (Tiempo Protrombina, Tiempo de Tromboplastina activada) los cuales deberían estar en parámetros normales a las 72 horas de su internamiento.

ASPECTOS ETICOS

Se realiza el presente estudio con un suplemento de L-Arginina previamente estandarizado y aprobado para uso clínico sin que existan riesgos adversos reportados en su uso. Así también se da el tratamiento correspondiente para todo paciente quemado, lo que implica una investigación sin riesgo, por lo que se siguen los Principios de la Bioética de Investigación en seres humanos, ajustándose a las consideraciones establecidas en la declaración de Helsinki, Finlandia de 1964, y en las consideraciones realizadas durante su revisión por la 29ª. Asamblea Médica Mundial, Tokio Japón, en 1975.

MÉTODO

PACIENTES:

FASE 1: FORMACIÓN DE GRUPOS DE ESTUDIO

Se han estudiado un total de 20 pacientes, formando 2 grupos de estudio aleatorizado, controlado con placebo.

GRUPO A - CONTROL: Este grupo de 10 pacientes en estudio comprendió sujetos que NO se les administro una suplementación alimenticia de L-Arginina, y se les administro un placebo isovolumetrico de 5 gr. formado por tabletas de alanina, iniciando el día previo a la cirugía.

GRUPO B – ESTUDIO: Este grupo de 10 pacientes en estudio comprendió sujetos que SI se les administro vía oral una suplementación alimenticia de 1 gr de L-Arginina por 10 días, iniciando el día previo a la cirugía.

Ambos grupos de pacientes llevaron una alimentación hiperproteica e isocalórica preparada por el servicio de nutrición del hospital.

La L-Arginina que se utilizo en el estudio fue producida por el laboratorio Twinlab con las siguientes especificaciones:

Supplement Facts	
Serving Size 1 Capsule	
Amount Per Serving	
L-Arginine (as L-arginine hydrochloride, L-arginine)	500 mg †
†Daily Value not established.	
Other Ingredients: Gelatin, cellulose, medium chain triglycerides, magnesium stearate.	

FASE 2: PREPARACIÓN DE ZONA DONADORA

Todos los pacientes se sometieron a toma y aplicación de injertos cutáneos en el Hospital General “Dr. Rubén Leñero” en el servicio de Quemados, bajo anestesia general y técnica estéril.

2.1.- Los injertos se tomaron mediante dermatomo (Padget ®) de un espesor de 0.015 pulgadas.

2.2.- Se toma biopsia por punción con Trucut desechable de 2mm en la zona donadora, considerando esta muestra como la basal “0”.

2.3.- En las heridas de la zona donadora se realizó hemostasia con solución con epinefrina (1000 ml de solución de cloruro de sodio con 1ml de epinefrina) y posteriormente se cubrió con organdí estéril, roseándole rifamicina spray al 1% .

FASE 3: TOMA DE MUESTRAS

3.1 - Ambos grupos en estudio se les realizó biopsia por punción con Trucut desechable de 2mm de diámetro en los días 0, 2, 5, 10 días del tratamiento. Previa aplicación de lidocaína en spray al 9% con técnica estéril.

Estos puntos de tiempo fueron elegidos para reflejar la fase inflamatoria en el día 2, la fase proliferativa en el día 5 y reepitelización en el día 10.

FASE 4: PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

4.1.- Las biopsias fueron fijadas en formol al 4%.

4.3.- Se procesaron por técnicas histológicas convencionales; inclusión en parafina, secciones con micrótomo y teñidas con hematoxilina-eosina.

4.4.- INFLAMACIÓN Y PROLIFERACIÓN: se cuantificaron los neutrófilos polimorfonucleares con aumento de 40x en las diferentes muestras de los días 2, 5 y 10 después de la cirugía.

4.5.- ANGIOGÉNESIS: se cuantifico la densidad de capilares en las biopsias midiendo la fijación por medio de inmunohistomarcadores CD31, específicos para musculo liso.

4.6.- REEPITELIZACIÓN: se realizo una medición en centímetros cuadrados del área donadora inicial y posteriormente su epitelización a los días 5 y 10, reportándose como porcentaje del total de la herida.

RESULTADOS

Veinte pacientes se incluyeron en el estudio, los cuales cumplieron los criterios de inclusión, se asignaron de forma aleatoria a dos grupos; Grupo A – Control formado por 10 sujetos que recibieron como placebo 5 gr diarios de alanina y el Grupo B – Estudio, formado por 10 individuos que recibieron la dosis de 5 gr diarios de arginina; ambas vía oral cada 8 horas.

No existieron paciente que se eliminaran del estudio.

Se registraron los siguientes parámetros: edad, índice de masa corporal, proteínas totales, albumina, leucocitos enseguida reportados.

TABLA 1 : GRUPO A (ALANINA)								
PACIENTE	GENERO (F/M)	EDAD (AÑOS)	PESO (KG)	CM	IMC (KG/CM2)	ALBUMINA (G/DL)	PROTEÍNAS TOTALES (G/DL)	%SCT QUEMADA
1	M	26	67	172	22.65	4.2	6.4	45
2	M	33	76	167	27.25	3.6	7.2	42
3	M	43	73	174	24.11	3.3	7.6	46
4	M	29	66	168	22.38	4.8	6.7	40
5	M	22	78	169	27.31	5.1	6.5	49
6	M	20	69	175	22.53	4.7	6.8	40
7	M	45	77	174	25.43	3.9	7.4	40
8	F	42	75	163	28.23	3.4	6.2	45
9	M	65	65	169	22.76	4.9	7.1	48
10	M	27	74	176	23.89	4.5	6.5	45
MEDIA (DE)	M:9 F:1	F+M:35 F:42 M: 34 (13.83)			F+M:24.65 F:28.23 M:24.25 (2.24)	F+M: 4.24 F: 3.4 M:4.3 (0.65)	F+M: 6.84 F: 6.2 M: 6.9 (0.46)	F+M: 44 F: 45 M: 44 (3.33)

Tabla 1: Características antropométricas y bioquímicas de los pacientes del Grupo A (Control) M: Masculino, F: Femenino, (DE): Desviación Estándar.

TABLA 2 : GRUPO B (L-ARGININA)								
PACIENTE	GENERO (F/M)	EDAD (AÑOS)	PESO (KG)	CM	IMC (KG/CM2)	ALBUMINA (G/DL)	PROTEÍNAS TOTALES (G/DL)	%SCT QUEMADA
1	M	27	65	172	21.97	4.5	6.7	40
2	F	35	76	157	30.83	4.1	6.9	45
3	F	42	72	155	29.97	4,8	6.6	42
4	M	38	78	173	26.06	3.9	7.2	45
5	M	45	69	172	23.32	4.4	6.9	47
6	M	67	71	175	23.18	4.8	6.7	42
7	M	29	77	177	24.58	5.2	6.2	45
8	M	41	73	168	25.86	4.6	7.4	48
9	M	46	81	165	29.75	4.4	7.5	45
10	M	53	75	170	29.95	4.3	7.1	40
MEDIA (DE)	M: 8 F: 2	F+M:35 F:43 M: 34 (11.69)			F+M:29.67 F: 30.4 M: 29.45 (3.31)	F+M: 4.5 F: 4.5 M: 4.5 (0.38)	F+M: 6.9 F: 6.75 M: 6.7 (0.39)	F+M: 44 F: 44 M: 44 (2.76)

Tabla 2: Características antropométricas y bioquímicas de los pacientes del Grupo B (Estudio) M: Masculino, F: Femenino, (DE): Desviación Estándar.

TABLA 3 : GRUPO A (ALANINA)								
PACIENTE	PMN/ POR CAMPO			NO DE VASOS/MICRAS			% EPITELIZACIÓN	
	2	5	10	2	5	10	5	10
1	5	4	3	6	4	8	30	60
2	6	7	5	4	2	6	35	70
3	8	6	4	5	3	7	25	55
4	7	5	2	6	5	6	35	32
5	3	3	2	2	4	7	25	75
6	7	5	4	5	3	6	30	80
7	6	6	5	8	4	9	35	70
8	6	4	3	6	3	7	30	65
9	8	6	4	5	3	8	35	75
10	6	4	3	7	3	6	25	70
MEDIA (DE)	6.2	5	3.5	5.4	3.4	7	30.5	65.2
	1.5	1.2	1.0	1.6	0.8	1.0	4.3	13.7

Tabla 3: Resultados del Grupo A (Control) de la cuenta de neutrófilos por campo (Inflamación y Proliferación) en los días 2, 5 y 10, del numero de vasos (Angiogénesis) en los días 2, 5 y 10 y del porcentaje de reepitelización en los días 5 y 10. PMN: Polimorfonucleares, (DE): Desviación Estándar.

TABLA 4 : GRUPO B (L-ARGININA)								
PACIENTE	PMN/ POR CAMPO			NO DE VASOS/MICRAS			% ÉPITELIZACIÓN	
	2	5	10	2	5	10	5	10
1	3	5	2	5	5	8	25	80
2	5	6	4	7	6	6	35	45
3	9	6	4	7	6	8	20	55
4	6	5	3	6	5	6	45	80
5	5	5	4	5	4	7	20	75
6	6	6	3	5	5	7	25	65
7	7	6	3	6	5	5	35	70
8	6	7	6	6	4	9	30	75
9	5	6	4	4	5	7	25	80
10	6	6	3	5	6	8	30	65
MEDIA	5.8	5.8	3.6	5.6	5.1	7.1	29	69
(DE)	1.5	0.6	1.0	0.9	0.7	1.1	7.7	11.7

Tabla 4: Resultados del Grupo B (Estudio) de la cuenta de neutrófilos por campo (Inflamación y Proliferación) en los días 2, 5 y 10, del numero de vasos (Angiogénesis) en los días 2, 5 y 10 y del porcentaje de reepitelización en los días 5 y 10. PMN: Polimorfonucleares, (DE): Desviación Estándar.

Ambas fórmulas de suplementación fueron bien toleradas y ambos grupos cumplieron el tratamiento, en las Tablas 1 y 2 se muestran las características de los dos grupos de pacientes. La edad osciló entre 20 y 67 años (media \pm DE: 39 ± 13). No se observó diferencia estadística entre los dos grupos de edad. Ambos grupos presentaron un estado metabólico comparable, el índice de masa corporal, todos los pacientes tuvieron $> 18,5$ (desnutrición) y osciló entre 21.9 a 30.8 (media \pm DE: 25.6 ± 2.9). Las proteínas totales oscilaron entre 6.2 a 7.5 gr/dl (media \pm DE: 4.3 ± 0.5) y la albúmina osciló entre 3.3 a 5.2 gr/dl (media \pm DE: 6.88 ± 0.4). No se observaron efectos adversos como vómito o diarrea.

EVALUACIÓN DE LA CICATRIZACIÓN DE HERIDAS

No se encontraron diferencias estadísticas entre los dos grupos en la cuantificación de los neutrófilos, la angiogénesis y la reepitelización (Gráfico 1, 2, 3,)

TABLA 5 : PRUEBA T								
PACIENTE	PMN/ POR CAMPO			NO DE VASOS/MICRAS			% EPITELIZACIÓN	
	2	5	10	2	5	10	5	10
PRUEBA T	0.42	0.06	0.84	0.74	0.01	0.85	0.43	0.56

Tabla 5: Prueba T Student entre los Grupos A y B en la cuantificación de Polimorfonucleares y Vasos en los días 2, 5 y 10 y el porcentaje de reepitelización en los días 5 y 10.

La cuantificación de neutrófilos en las biopsias de las heridas (Grafico 1) disminuyó significativamente en ambos grupos entre los días 2 y 10 días ($p = 0,008$ para ambos grupos) y el día 5 y 10 días ($p = 0,049$ para el Grupo A y $p = 0,019$ Grupo B). No existió una diferencia estadística significativa en la disminución de neutrófilos en los días posteriores.

La angiogénesis (Grafico 2) se expreso como el número de capilares por campo, tanto en el grupo control y el de estudio entre los días 2, 5 y 10 días (respectivamente $p = 0,007$ y $p < 0,001$). No se encontraron diferencias estadísticas significativas para el número de capilares en los días posteriores entre ambos grupos.

La evaluación de la reepitelización expresado como porcentaje del total de la herida superficial (Grafico 3) fue similar para ambos grupos en el día 5 y el día 10 después de la cirugía.

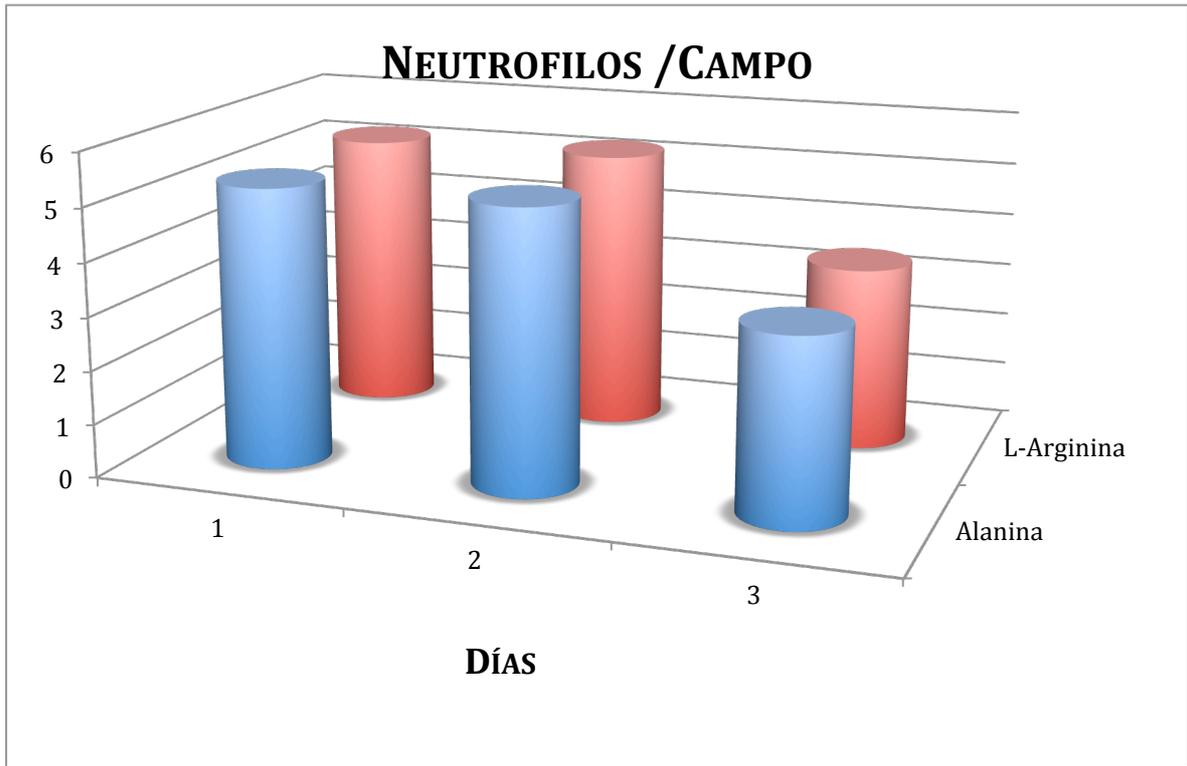


GRAFICO 1 : INFLAMACIÓN Y PROLIFERACIÓN: cuantificación de los neutrófilos polimorfonucleares con aumento de 40x en los días 2 (1), 5 (2) y 10 (3) después de la cirugía.

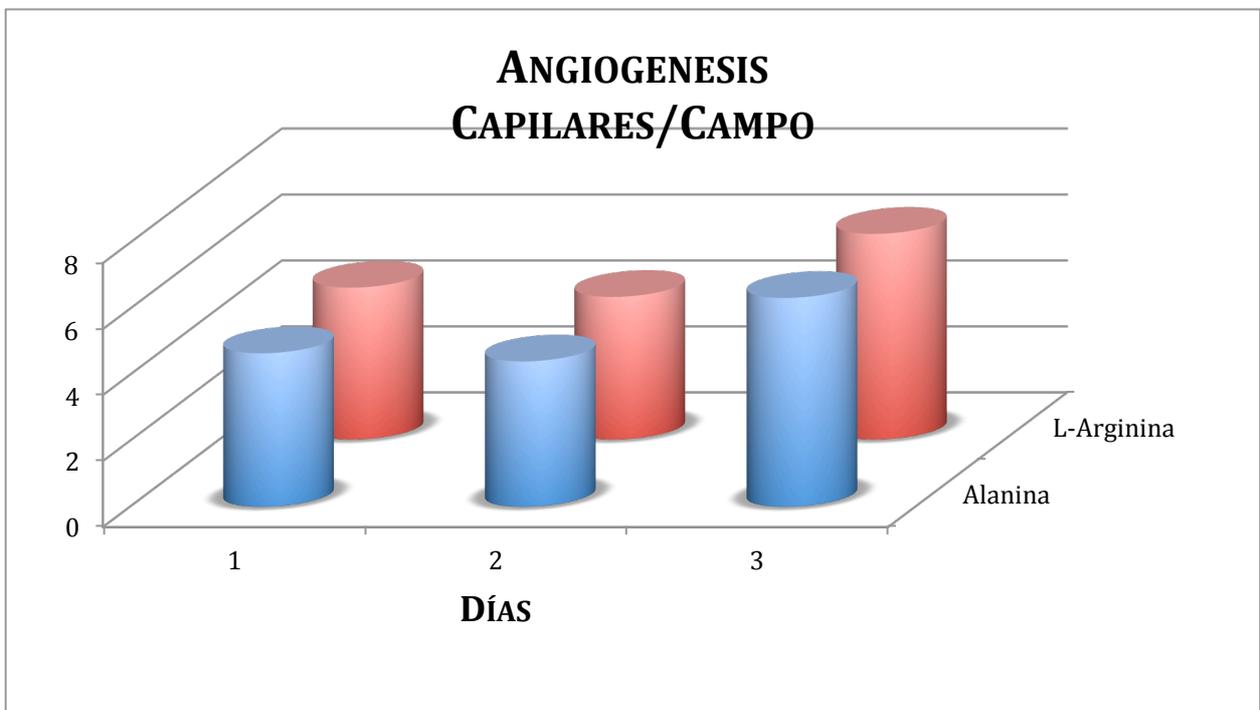


GRAFICO 2 : ANGIOGÉNESIS: cuantificación de capilares en las biopsias midiendo la fijación por medio de inmunohistomarcadores CD31, específicos para musculo liso en los días 2 (1), 5 (2) y 10 (3) posteriores a la cirugía.

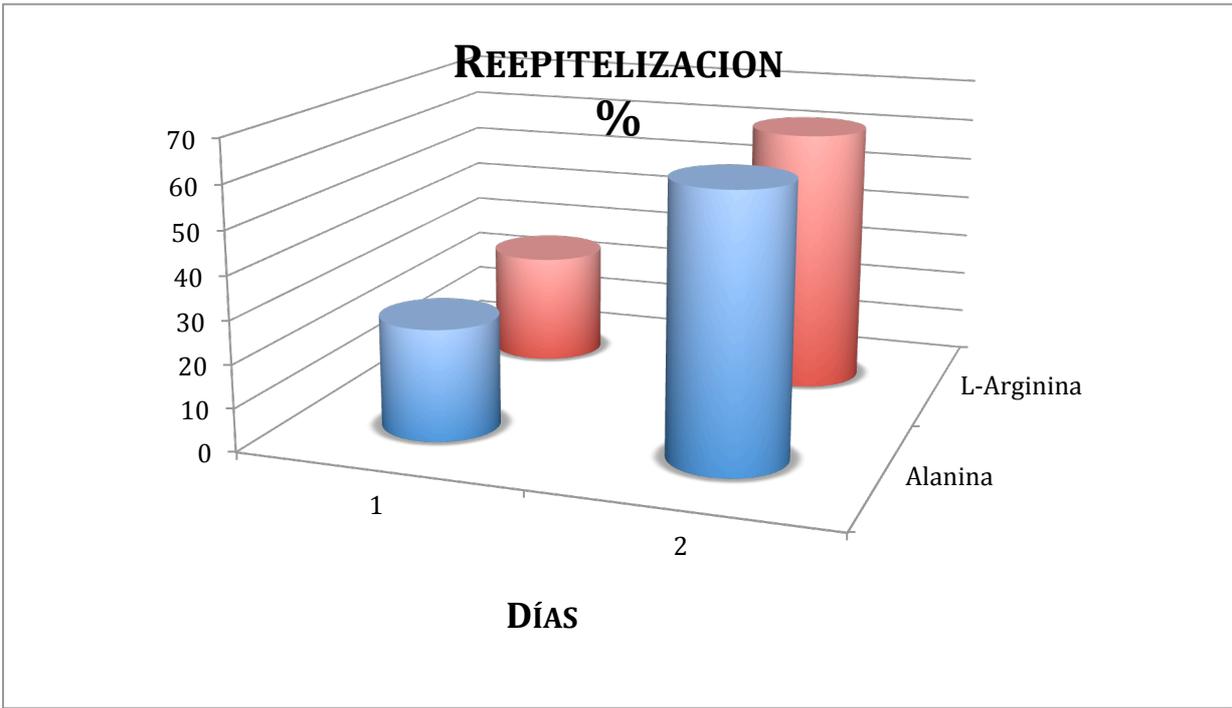


GRAFICO 3 : REEPITELIZACIÓN: se realizo una medición en centímetros cuadrados del área donadora inicial y posteriormente su epitelización a los días 5 (1) y 10 (2), reportándose como porcentaje del total de la herida.

DISCUSIÓN

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el efecto de arginina en la cicatrización de las heridas en pacientes relativamente sanos. No se encontraron diferencias entre los dos grupos en la evaluación de reepitelización, la angiogénesis y la proliferación de neutrófilos en la herida como parámetros de la cicatrización de heridas .

La afluencia de los neutrófilos en la herida fue evaluada para evaluar la fase inflamatoria esencial de la curación de heridas . Varios estudios han indicado un aumento de la respuesta inmune en la administración de arginina . Otros encuentran una disminución de la tasa de infección en la suplementación con arginina. Nuestros resultados no mostraron diferencias de la afluencia de neutrófilos en la herida para ambos grupos, lo que sugiere reacción inflamatoria similar en ambos grupos. En correlación a este hallazgo no se presentaron infección de las heridas.

La angiogénesis se evaluó como un segundo parámetro clínico de la cicatrización de heridas . El proceso de la angiogénesis está mediado por el Oxido Nítrico. Los estudios in vitro muestran que los neutrófilos producen Oxido Nítrico. Los estudios experimentales han planteado la hipótesis de que el aumento de los niveles locales de estimulan la producción de Oxido Nítrico por los neutrófilos de la herida, lo que aumentaría los procesos dependientes del Oxido Nítrico como es la angiogénesis. Sin embargo, no encontramos cambios significativos estadísticamente.

En la reepitelización los resultados del presente estudio, no mostraron mayor reepitelización en el grupo estudio suplementado con arginina en su día 10 posterior a la cirugía.

Nuestros resultados difieren de los hallazgos de otros autores. Diversas explicaciones se pueden proponer para nuestros hallazgos. En primer lugar, la mayoría de los estudios previos participaron grupos de pacientes heterogéneos con múltiples diagnósticos de base y con otras comorbilidades, nuestros dos grupos fueron por pacientes relativamente sanos, sin otras enfermedades agregadas.

CONCLUSION

Aunque el número de sujetos del estudio no es suficiente para establecer conclusiones firmes, los resultados sugieren que la administración de L-Arginina como suplementación alimenticia no es benéfica para modular la respuesta inmune, la angiogénesis o la reepitelización del sitio donador de injertos. Por lo tanto, la hipótesis de que la suplementación con L-Arginina sólo podría afectar a la cicatrización de las heridas cuando existe un agotamiento de arginina sistémica. Se necesitan más estudios para evaluar el efecto de la suplementación de L-Arginina y otros aminoácidos en diferentes situaciones clínicas.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Nirgiotis JG, Hennessey PJ, Andrassy RJ. The effects of an arginine-free enteral diet on wound healing and immune function in the postsurgical rat. *J Pediatr Surg* 1991; 26:936–41.
- [2] Schaffer MR, Tantry U, Ahrendt GM, Wasserkrug HL, Barbul A. Acute protein-calorie malnutrition impairs wound healing: a possible role of decreased wound nitric oxide synthesis. *J Am Coll Surg* 1997;184:37–43.
- [3] Seifter E, Rettura G, Barbul A, Levenson SM. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery* 1978;84: 224–30.
- [4] Witte MB, Thornton FJ, Tantry U, Barbul A. L-Arginine supplementation enhances diabetic wound healing: involvement of the nitric oxide synthase and arginase pathways. *Metabolism* 2002;51:1269–73.
- [5] Angele MK, Nitsch SM, Hatz RA, Angele P, Hernandez- Richter T, Wichmann MW, et al. L-Arginine: a unique amino acid for improving depressed wound immune function following hemorrhage. *Eur Surg Res* 2002;34: 53–60.
- [6] Canturk NZ, Vural B, Canturk Z, Esen N, Vural S, Solakoglu S, et al. The role of L-arginine and neutrophils on incisional wound healing. *Eur J Emerg Med* 2001;8:311–5.
- [7] Shi HP, Wang SM, Zhang GX, Zhang YJ, Barbul A. Supplemental L-arginine enhances wound healing following trauma/hemorrhagic shock. *Wound Repair Regen* 2007;15:66–70.
- [8] Akbarshahi H, Andersson B, Norden M, Andersson R. Perioperative nutrition in elective gastrointestinal surgery—potential for improvement? *Dig Surg* 2008;25: 165–74.
- [9] Kirk HJ, Heys SD. Immunonutrition. *Br J Surg* 2003;90: 1459–60.
- [10] Tsuei BJ, Bernard AC, Barksdale AR, Rockich AK, Meier CF, Kearney PA. Supplemental enteral arginine is metabolized to ornithine in injured patients. *J Surg Res* 2005;123: 17–24.
- [11] de Luis DA, Izaola O, Cuellar L, Terroba MC, Arranz M, Fernandez N, et al. Effect of c-reactive protein and interleukins blood levels in postsurgery arginine-enhanced enteral nutrition in head and neck cancer patients. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:96–9.

- [12] de Luis DA, Arranz M, Aller R, Izaola O, Cuellar L, Terroba MC. Immunoenhanced enteral nutrition, effect on inflammatory markers in head and neck cancer patients. *Eur J Clin Nutr* 2005;59:145–7.
- [13] Arana V, Paz Y, Gonzalez A, Mendez V, Mendez JD. Healing of diabetic foot ulcers in L-arginine-treated patients. *Biomed Pharmacother* 2004;58:588 - 97.
- [14] Song JX, Qing SH, Huang XC, Qi DL. Effect of parenteral nutrition with L-arginine supplementation on postoperative immune function in patients with colorectal cancer. *Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao* 2002;22:545–7.
- [15] Riso S, Aluffi P, Brugnani M, Farinetti F, Pia F, D’Andrea F. Postoperative enteral immunonutrition in head and neck cancer patients. *Clin Nutr* 2000;19:407–12.
- [16] de Luis DA, Izaola O, Cuellar L, Terroba MC, Aller R. Randomized clinical trial with an enteral arginineenhanced formula in early postsurgical head and neck cancer patients. *Eur J Clin Nutr* 2004;58:1505–8.
- [17] de Luis DA, Izaola O, Cuellar L, Terroba MC, Martin T, Aller R. Clinical and biochemical outcomes after a randomized trial with a high dose of enteral arginine formula in postsurgical head and neck cancer patients. *Eur J Clin Nutr* 2007;61:200–4.
- [18] Casas-Rodera P, Gomez-Candela C, Benitez S, Mateo R, Armero M, Castillo R, et al. Immunoenhanced enteral nutrition formulas in head and neck cancer surgery: a prospective, randomized clinical trial. *Nutr Hosp* 2008;23:105–10.
- [19] de Luis DA, Aller R, Izaola O, Cuellar L, Terroba MC. Postsurgery enteral nutrition in head and neck cancer patients. *Eur J Clin Nutr* 2002;56:1126–9.
- [20] Peng X, Yi D, Fan SZ, Liao ZJ, Yao YZ, Cong TQ, et al. Analysis of the influence on the prognosis and safety of arginine in patients with severe trauma and burns—a multi-center randomized double blinded, placebo controlled, clinical trial in 86 patients. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi* 2006;22:243–6.
- [21] De Luis DA, Izaola O, Cuellar L, Terroba MC, Martin T, Aller R. High dose of arginine enhanced enteral nutrition in postsurgical head and neck cancer patients. A randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2009;13: 279–83.
- [22] Marin VB, Rodriguez-Osiac L, Schlessinger L, Villegas J, Lopez M, Castillo-

Duran C. Controlled study of enteral arginine supplementation in burned children: impact on immunologic and metabolic status. *Nutrition* 2006;22:705–12.

[23] Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery* 1990;108:331–6 [discussion 336–7].

[24] Kirk SJ, Hurson M, Regan MC, Holt DR, Wasserkrug HL, Barbul A. Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery* 1993;114:155–9 [discussion 160].

[25] Daly JM, Lieberman MD, Goldfine J, Shou J, Weintraub F, Rosato EF, et al. Enteral nutrition with supplemental arginine, RNA, and omega-3 fatty acids in patients after operation: immunologic, metabolic, and clinical outcome. *Surgery* 1992;112:56–67.

[26] Braga M, Gianotti L, Vignali A, Carlo VD. Preoperative oral arginine and n-3 fatty acid supplementation improves the immunometabolic host response and outcome after colorectal resection for cancer. *Surgery* 2002;132:805–14.

[27] Farreras N, Artigas V, Cardona D, Rius X, Trias M, Gonzalez JA. Effect of early postoperative enteral immunonutrition on wound healing in patients undergoing surgery for gastric cancer. *Clin Nutr* 2005;24:55–65.

[28] Sorensen D, McCarthy M, Baumgartner B, Demars S. Perioperative immunonutrition in head and neck cancer. *Laryngoscope* 2009;119:1358–64.

[29] Wibbenmeyer LA, Mitchell MA, Newel IM, Faucher LD, Amelon MJ, Ruffin TO, et al. Effect of a fish oil and arginine-fortified diet in thermally injured patients. *J Burn Care Res* 2006;27:694–702.

[30] Gunerhan Y, Koksak N, Sahin UY, Uzun MA, Eksioglu- Demiralp E. Effect of preoperative immunonutrition and other nutrition models on cellular immune parameters. *World J Gastroenterol* 2009;15:467–72.

[31] Stableforth WD, Thomas S, Lewis SJ. A systematic review of the role of immunonutrition in patients undergoing surgery for head and neck cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2009;38:103–10.

[32] Williams JZ, Abumrad N, Barbul A. Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. *Ann Surg* 2002;236:369–74 [discussion 374–5].

- [33] Sheridan RL. Burn care: results of technical and organizational progress. *JAMA* 2003;290:719–22.
- [34] Debats IB, Booi DI, Wehrens KM, Cleutjens J, Deutz NE, van de Hogen E, et al. Oral arginine supplementation and the effect on skin graft donor sites: a randomized clinical pilot study. *J Burn Care Res* 2009;30:417–26.
- [35]. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994;78(6):915-8. Citation
- [36]. Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 1992;2(12):3051-64. Abstract
- [37]. Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993;316(2):175-80. Abstract
- [38]. Michel T, Winslow JW, Smith JA, Seidman JG, Neer EJ. Molecular cloning and characterization of cDNA encoding the GTP-binding protein alpha i and identification of a related protein, alpha h. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83(20):7663-7. Abstract
- [39]. Abu-Soud HM, Stuehr DJ. Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90(22):10769-72. Abstract
- [40]. Wang J, Stuehr DJ, Ikeda-Saito M, Rousseau DL. Heme coordination and structure of the catalytic site in nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1993;268(30):22255-8. Abstract
- [41]. Morris SM, Billiar TR. New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am J Physiol* 1994;266(6 Pt 1):E829-39. Abstract
- [42]. Nussler AK, Billiar TR. Inflammation, immunoregulation, and inducible nitric oxide synthase. *J Leukoc Biol* 1993;54(2):171-8. Abstract
- [43]. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, et al. Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J Exp Med* 1992;176(2):599-604. Abstract
- [44]. Reichner JS, Meszaros AJ, Louis CA, Henry Jr. WL, Mastrofrancesco B, Martin BA, et al. Molecular and metabolic evidence for the restricted expression of inducible nitric oxide synthase in healing wounds. *Am J Pathol* 1999;154(4):1097-104. Abstract

- [45]. Heck DE, Laskin DL, Gardner CR, Laskin JD. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. *J Biol Chem* 1992;267(30):21277-80. Abstract
- [46]. Arany I, Brysk MM, Brysk H, Tying SK. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;220(3):618-22. Abstract
- [47]. Hood JD, Meininger CJ, Ziche M, Granger HJ. VEGF upregulates eNOS message, protein, and NO production in human endothelial cells. *Am J Physiol* 1998;274(3 Pt 2):H1054-8. Abstract
- [48]. van Der ZR, Murohara T, Luo Z, Zollmann F, Passeri J, Lekutat C, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor augments nitric oxide release from quiescent rabbit and human vascular endothelium. *Circulation* 1997;95(4):1030-7. Abstract
- [49]. Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE. Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production are reduced in hypertrophic scar tissue and fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1997;108(4):438-44. Abstract
- [50]. Schaffer MR, Efron PA, Thornton FJ, Klingel K, Gross SS, Barbul A. Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function. *J Immunol* 1997;158(5):2375-81. Abstract
- [51]. Frank S, Madlener M, Pfeilschifter J, Werner S. Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair. *J Invest Dermatol* 1998;111(6):1058-64. Abstract
- [52]. Ma L, Wallace JL. Endothelial nitric oxide synthase modulates gastric ulcer healing in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000;279(2):G341-6. Abstract
- [53]. Albina JE, Mills CD, Henry Jr. WL, Caldwell MD. Temporal expression of different pathways of 1-arginine metabolism in healing wounds. *J Immunol* 1990;144(10):3877-80. Abstract
- [20]. Schaffer MR, Tantry U, Gross SS, Wasserburg HL, Barbul A. Nitric oxide regulates wound healing. *J Surg Res* 1996;63(1):237-40. Abstract
- [54]. Onuoha G, Alpar K, Jones I. Vasoactive intestinal peptide and nitric oxide in the acute phase following burns and trauma. *Burns* 2001;27(1):17-

21. Abstract

- [55]. Seiffter E, Rettura G, Barbul A, Levenson SM. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery* 1978;84(2):224-30. Abstract
- [56]. Barbul A, Lazarou SA, Efron DT, Wasserkrug HL, Efron G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery* 1990;108(2):331-6. Abstract
- [57]. Kirk SJ, Hurson M, Regan MC, Holt DR, Wasserkrug HL, Barbul A. Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery* 1993;114(2):155-9. Abstract
- [58]. Arbss MA, Ferrando JM, Vidal J, Quiles MT, Huguet P, Castells J, et al. Early effects of exogenous arginine after the implantation of prosthetic material into the rat abdominal wall. *Life Sci* 2000;67(20):2493-512. Abstract
- [59]. Li H, Meininger CJ, Hawker Jr. JR, Haynes TE, Kepka-Lenhart D, Mistry SK, et al. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;280(1):E75-82. Abstract
- [60]. Shi HP, Efron DT, Most D, Tantry US, Barbul A. Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible nitric oxide synthase knockout mice. *Surgery* 2000;128(2):374-8. Abstract
- [61]. Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovesdi I, et al. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 1998;101(5):967-71. Abstract
- [62]. Efron DT, Thornton FJ, Steulten C, Tantry US, Witte MB, Kiyama T, et al. Expression and function of inducible nitric oxide synthase during rat colon anastomotic healing. *J Gastrointest Surg* 1999;3(6):592-601. Abstract
- [63]. Lee PC, Salyapongse AN, Bragdon GA, Shears LL, Watkins SC, Edington HD, et al. Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Am J Physiol* 1999;277(4 Pt 2):H1600-8. Abstract
- [64]. Schaffer MR, Tantry U, Thornton FJ, Barbul A. Inhibition of nitric oxide synthesis in wounds: pharmacology and effect on accumulation of collagen in wounds in mice. *Eur J Surg* 1999;165(3):262-7. Abstract

- [65]. Akcay MN, Ozcan O, Gundogdu C, Akcay G, Balik A, Kose K, et al. Effect of nitric oxide synthase inhibitor on experimentally induced burn wounds. *J Trauma* 2000;49(2):327-30. Abstract
- [66]. Shabani M, Pulfer SK, Bulgrin JP, Smith DJ. Enhancement of wound repair with a topically applied nitric oxide-releasing polymer. *Wound Repair Regen* 1996;4:353-62.
- [67]. Schaffer MR, Tantry U, Ahrendt GM, Wasserkrug HL, Barbul A. Acute protein-calorie malnutrition impairs wound healing: a possible role of decreased wound nitric oxide synthesis. *J Am Coll Surg* 1997;184(1):37-43. Abstract
- [68]. Schwentker A, Salyapongse AN, Vodovotz Y, Billiar TR. Effect of adenoviral inducible nitric oxide synthase transfection on healing of steroid-treated murine wounds. [abstract] *Surg Forum* 2001;52:540-2.
- [69]. Schaffer MR, Tantry U, Efron PA, Ahrendt GM, Thornton FJ, Barbul A. Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation. *Surgery* 1997;121(5):513-9. Abstract
- [70]. Lim TC, Mochhala SM, Tan Walter TL, Chhatwal VJ, Suhumaran S, Hon WM, et al. Downregulation of inducible nitric oxide synthase expression in keloids. [letter] *Plast Reconstr Surg* 1996;98(5):911-2. Citation
- [71]. Weller R, Ormerod A. Increased expression of inducible nitric oxide (NO) synthase. *Br J Dermatol* 1997;136(1):136-7. Citation
- [72]. Shukla A, Rasik AM, Shankar R. Nitric oxide inhibits wounds collagen synthesis. *Mol Cell Biochem* 1999;200(1-2):27-33. Abstract
- [73]. Thornton FJ, Ahrendt GM, Schaffer MR, Tantry US, Barbul A. Sepsis impairs anastomotic collagen gene expression and synthesis: a possible role for nitric oxide. *J Surg Res* 1997;69(1):81-6. Abstract
- [74]. Jude EB, Boulton AJ, Ferguson MW, Appleton I. The role of nitric oxide synthase isoforms and arginase in the pathogenesis of diabetic foot ulcers: possible modulatory effects by transforming growth factor beta I. *Diabetologia* 1999;42:748-57. Abstract
- [75]. Bulgrin JP, Shabani M, Chakravarthy D, Smith DJ. Nitric oxide synthesis is suppressed in steroid-impaired and diabetic wounds. *Wounds* 1995;7(2):48-57.
- [76]. Zykova SN, Jenssen TG, Berdal M, Olsen R, Myklebust R, Seljelid R. Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic

type II-like db/db mice. *Diabetes* 2000;49(9):1451-8. Abstract

[77]. Stuehr DJ, Gross SS, Sakuma I, Levi R, Nathan CF. Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide. *J Exp Med* 1989;169(3):1011-20. Abstract

[78]. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1988;255(6 Pt 2):H1269-75. Abstract

[79]. Mills CD, Shearer J, Evans R, Caldwell MD. Macrophage arginine metabolism and the inhibition or stimulation of cancer. *J Immunol* 1992;149(8):2709-14. Abstract

[80]. Green SJ, Mellouk S, Hoffman SL, Meltzer MS, Nacy CA. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. *Immunol Lett* 1990;25(1-3):15-9. Abstract

[81]. Adams LB, Hibbs Jr. JB, Taintor RR, Krahenbuhl JL. Microbiostatic effect of murine-activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. *J Immunol* 1990;144(7):2725-9. Abstract

[82]. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89(7):3030-4. Abstract

[83]. Salvemini D, de Nucci G, Gryglewski RJ, Vane JR. Human neutrophils and mononuclear cells inhibit platelet aggregation by releasing a nitric oxide-like factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86(16):6328-32. Abstract

[84]. Yuan Y, Granger HJ, Zawieja DC, DeFily DV, Chilian WM. Histamine increases venular permeability via a phospholipase C-NO synthase-guanylate cyclase cascade. *Am J Physiol* 1993;264(5 Pt 2):H1734-9. Abstract

[85]. Wu HM, Huang Q, Yuan Y, Granger HJ. VEGF induces NO-dependent hyperpermeability in coronary venules. *Am J Physiol* 1996;271(6 Pt 2):H2735-9. Abstract

[86]. Frank S, Kampfer H, Wetzler C, Stallmeyer B, Pfeilschifter J. Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression. *Biochem J* 2000;347(Pt 1):265-73. Abstract

- [87]. Wetzler C, Kampfer H, Pfeilschifter J, Frank S. Keratinocyte-derived chemotactic cytokines: expressional modulation by nitric oxide in vitro and during cutaneous wound repair in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274(3):689-96. Abstract
- [88]. Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S. The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelialization. *J Invest Dermatol* 1999;113(6):1090-8. Abstract
- [89]. Krischel V, Bruch-Gerharz D, Suschek C, Kroncke KD, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J Invest Dermatol* 1998;111(2):286-91. Abstract
- [90]. Witte MB, Thornton FJ, Efron DT, Barbul A. Enhancement of fibroblast collagen synthesis by nitric oxide. *Nitric Oxide* 2000;4(6):572-82. Abstract
- [91]. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83(5):1774-7. Abstract
- [92]. Tzeng E, Kim YM, Pitt BR, Lizonova A, Kovesdi I, Billiar TR. Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis. *Surgery* 1997;122(2):255-63. Abstract
- [93]. Papapetropoulos A, Garcia-Cardena G, Madri JA, Sessa WC. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 1997;100(12):3131-9. Abstract
- [94]. Shizukuda Y, Tang S, Yokota R, Ware JA. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase Cdelta activity. *Circ Res* 1999;85(3):247-56. Abstract
- [95]. Murohara T, Asahara T, Silver M, Bauters C, Masuda H, Kalka C, et al. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 1998;101(11):2567-78. Abstract

- [96]. Konturek SJ, Brzozowski T, Majka J, Pytko-Polonczyk J, Stachura J. Inhibition of nitric oxide synthase delays healing of chronic gastric ulcers. *Eur J Pharmacol* 1993;239(1–3):215-7. Abstract
- [97]. Nissen NN, Polverini PJ, Koch AE, Volin MV, Gamelli RL, DiPietro LA. Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am J Pathol* 1998;152(6):1445-52. Abstract
- [98]. Ziche M, Morbidelli L, Choudhuri R, Zhang HT, Donnini S, Granger HJ, et al. Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 1997;99(11):2625-34. Abstract
- [99]. Parenti A, Morbidelli L, Cui XL, Douglas JG, Hood JD, Granger HJ, et al. Nitric oxide is an upstream signal of vascular endothelial growth factor-induced extracellular signal-regulated kinase1/2 activation in postcapillary endothelium. *J Biol Chem* 1998;273(7):4220-6. Abstract
- [100]. Morbidelli L, Chang CH, Douglas JG, Granger HJ, Ledda F, Ziche M. Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* 1996;270(1 Pt 2):H411-5. Abstract
- [68]. Noiri E, Peresleni T, Srivastava N, Weber P, Bahou WF, Peunova N, et al. Nitric oxide is necessary for a switch from stationary to locomoting phenotype in epithelial cells. *Am J Physiol* 1996;270(3 Pt 1):C794-802. Abstract
- [101]. Noiri E, Lee E, Testa J, Quigley J, Colflesh D, Keese CR, et al. Podokinesis in endothelial cell migration: role of nitric oxide. *Am J Physiol* 1998;274(1 Pt 1):C236-44. Abstract
- [102]. Xiong M, Elson G, Legarda D, Leibovich SJ. Production of vascular endothelial growth factor by murine macrophages: regulation by hypoxia, lactate, and the inducible nitric oxide synthase pathway. *Am J Pathol* 1998;153(2):587-98. Abstract
- [103]. Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 1992;176(5):1375-9. Abstract
- [104]. Frank S, Stallmeyer B, Kampfer H, Kolb N, Pfeilschifter J. Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in

- cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair. *FASEB J* 1999;13(14):2002-14. Abstract
- [105]. Leibovich SJ, Polverini PJ, Fong TW, Harlow LA, Koch AE. Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91(10):4190-4. Abstract
- [106]. Ziche M, Morbidelli L, Masini E, Amerini S, Granger HJ, Maggi CA, et al. Nitric oxide mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P. *J Clin Invest* 1994;94(5):2036-44. Abstract
- [107]. Tsurumi Y, Murohara T, Krasinski K, Chen D, Witzendichler B, Kearney M, et al. Reciprocal relation between VEGF and NO in the regulation of endothelial integrity. *Nat Med* 1997;3(8):879-86. Abstract
- [108]. Muscara MN, McKnight W, Asfaha S, Wallace JL. Wound collagen deposition in rats: effects of an NO-NSAID and a selective COX-2 inhibitor. *Br J Pharmacol* 2000;129(4):681-6. Abstract
- [109]. Thornton FJ, Schaffer MR, Witte MB, Moldawer LL, MacKay SL, Abouhamze A, et al. Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;246(3):654-9. Abstract